

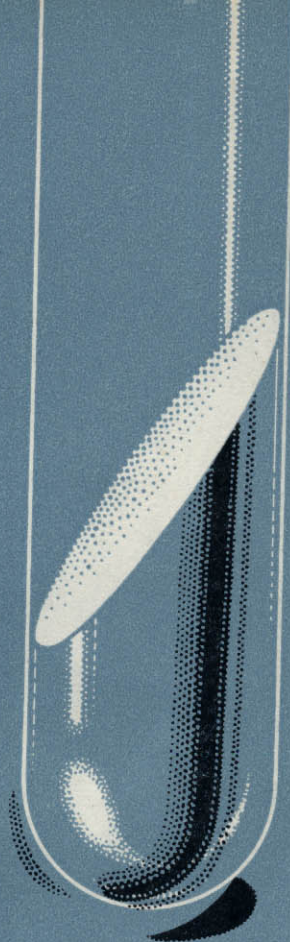
VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

М. А. ЛИТВИНОВ
И. А. ДУДКА

•

МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ
МИКРОСКОПИЧЕСКИХ
ГРИБОВ ПРЕСНЫХ
И СОЛЕННЫХ (МОРСКИХ)
ВОДОЕМОВ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ВСЕСОЮЗНОЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО

М. А. ЛИТВИНОВ
И. А. ДУДКА

МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ
МИКРОСКОПИЧЕСКИХ
ГРИБОВ ПРЕСНЫХ
И СОЛЕННЫХ (МОРСКИХ)
ВОДОЕМОВ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
ЛЕНИНГРАДСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
Ленинград • 1975

Методы исследования микроскопических грибов пресных и соленых (морских) водоемов. Литвинов М. А., Дудка И. А. 1975. Изд-во «Наука», Ленингр. отд. Л. 1—151.

В книге изложены современные методы исследования водных микроскопических грибов разных систематических групп, населяющих пресные и соленые, в частности морские, проточные и стоячие, наземные и подземные водоемы. Успешное изучение видового состава водных грибов, их распространения в различных типах акваторий, расположенных в разных географических зонах, их взаимосвязей с окружающей водной средой и т. д. в значительной степени зависит от правильности выбора и совершенства примененных методов исследования. Водные микроскопические грибы вместе с другими микроорганизмами активно участвуют в биохимических процессах общего круговорота веществ, совершающихся в водоемах. Среди водных грибов встречаются паразиты, в частности возбудители ряда опаснейших инфекционных заболеваний водорослей, рыб и других водных организмов, приводящие их к гибели и в связи с этим к снижению биологических пищевых ресурсов в водоемах. Ряд водных грибов является важнейшим компонентом биологических обрастаний надводных и подводных сооружений, обуславливающих биоразрушения различных материалов. Книга состоит из двух глав: первая посвящена описанию методов исследования грибов, обитающих в пресных водоемах, вторая — в соленых водоемах (маршах, эстуариях, морях и океанах). Каждая глава снабжена списком литературы. Книга рассчитана на научных работников и аспирантов систематиков микологов и микробиологов. Илл. — 24, табл. — 2+6 табл. в Приложении, библи. — 542 назв.

Введение

Грибы, населяющие различные пресные и соленые (морские) водоемы, составляют большую экологическую группу микромицетов из представителей классов *Phycomycetes*, *Ascomycetes*, *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*) и реже класса *Basidiomycetes*. В открытых водоемах наряду с типичными (настоящими) водными грибами, постоянно развивающимися в водных условиях на живых и мертвых органических субстратах, главным образом речного, озерного, морского или океанического происхождения, обнаруживаются грибы, не являющиеся типично водными. Последние заносятся в водоемы вместе с опавшими листьями, ветвями и другими наземными растительными и животными остатками, а также воздушными течениями, движущимися со стороны континентов и несущими огромное количество жизнеспособных спор различных грибов, и в особенности почвенных.

Весь цикл онтогенетического развития типичных водных грибов совершается в водных условиях. У наиболее примитивных из них — фикомицетов — размножение осуществляется посредством зооспор. Нужно отметить, что зооспоры, обладающие подвижностью, имеют мало преимуществ по сравнению с неподвижными спорами, так как течение воды в водоемах много сильнее двигательных усилий зооспор грибов. Движение зооспор имеет лишь то биологическое значение в жизни грибов, что они способны в условиях водной среды отыскать или выбрать питательный субстрат, на который они оседают благодаря наличию положительного таксиса к последнему. К водным грибам помимо фикомицетов относятся некоторые сумчатые и многие из несовершенных грибов, в частности гифомицеты, произошедшие, по-видимому, от наземных предков, переселившихся в воду с суши, частично, возможно, вместе с пораженным субстратом.

Весьма своеобразной является флора так называемых типичных водных гифомицетов, постоянно обнаруживаемая на погруженных в воду разлагающихся (скелетонизированных) листьях листопадных пород древесных растений и кустарников. Особенно часто эти грибы встречаются на подобных листьях в пресных хорошо аэрируемых водоемах, в небольших реках с не очень

медленным течением. Водные гифомицеты развиваются главным образом на черешках и больших жилках листьев, причем мицелий распространяется в разлагающихся тканях листа, а конидиеносцы выступают под прямым углом к его поверхности (Инголд, 1957). Споры у большинства видов водных гифомицетов имеют своеобразную и довольно характерную форму. Они разветвлены и чаще всего обладают четырьмя лучеобразными отростками, выходящими из одной точки. Этот тип спор несомненно имеет большое биологическое значение для выживаемости грибных организмов в водной среде, так как подобная форма спор затрудняет оседание их на дно водоема и способствует длительному нахождению в толще воды во взвешенном состоянии.

Что касается сумчатых грибов, обитающих в различных водоемах, то они мало отличаются от наземных форм. Все они по многим данным не являются первоначально водными формами, а произошли от грибов, обитающих на суше. Однако аскоспоры у этих сумчатых грибов все же обладают некоторыми особенностями, присущими спорам водных организмов, в частности они большей частью вытянуты в виде длинных нитей, кончики которых липкие, или, не будучи нитевидными, часто имеют развитые слизистые оболочки или выросты, что облегчает им возможность прикрепляться к питательному субстрату, а также пребывать в воде продолжительное время во взвешенном состоянии. Сумки, находящиеся в апотециях или перитециях, в условиях водной среды нормально созревают и высвобождают аскоспоры. Среди водных сумчатых грибов встречаются виды из разных порядков, семейств и родов. Сумчатые грибы (как дискомицеты, так и пиреномицеты) довольно часто встречаются в пресных водоемах на погруженных в воду стеблях растений и на опавших ветвях и сучьях деревьев. Морские сумчатые грибы представлены двумя основными биологическими группами. Виды одной группы развиваются как сапрофиты, главным образом на древесине и рыболовных снастях, а виды другой группы являются паразитами крупных морских водорослей.

Все водные грибы, будучи гетеротрофными организмами, играют существенную роль в общем круговороте веществ в водоемах, принимая активное участие в процессах разложения и минерализации различных органических субстратов, находящихся как на поверхности, так и в толще водных масс. Своей жизнедеятельностью водные грибы способствуют самоочищению водоемов и поэтому могут быть использованы для искусственной очистки промышленных вод, а также в качестве индикаторов степени загрязнения водоема (Šolin, 1955; Hanuška, 1956, 1967, 1968; Landa, Eliášek, 1956, 1959; Palatý, 1958; Cooke, 1962; Sládečková, 1963; Коколия, Волгина, 1967; Логвиненко, 1970).

Вместе с положительным значением, которое водные грибы имеют в сложной экосистеме, какой является водоем, нельзя

не отметить и отрицательную их роль. Некоторая часть водных грибов паразитирует на рыбах и их икре, обуславливая у них развитие инфекционных болезней: сапролегниоз, дерматомироз, болезнь Шеффера и др. (Tiffney, Wolf, 1937; Tiffney, 1939a, 1939b; Willoughby, 1968a, 1970; Бауер и др., 1969). Среди водных грибов, в особенности представителей пор. *Chytridiales* (*Phycomycetes*), известно немало видов, которые являются облигатными паразитами водорослей. В отдельные годы массовое развитие этих грибов-паразитов вызывает эпифитотии у водорослей, приводящие к резкому нарушению пищевых цепей и снижению кормовых ресурсов в водоеме, что приносит значительный ущерб рыбному хозяйству (Canter, Lund, 1948, 1951, 1953; Sparrow, 1951; Canter, 1969). Ряд видов водных грибов является компонентом биологических обростаний, составляя при этом значительную часть их биомассы, которая забивает водопроводные трубы различного диаметра, ячеи рыболовных сетей, вызывает явление биокоррозии, придает нежелательный вкус и запах питьевой воде и т. д. (Павлинова, 1933, 1935, 1952; Разумов, 1935, 1953; Коколия, 1967a, 1967b, 1969, и др.).

Помимо определенного практического значения, исследование водных грибов как большой экологической группы микромицетов имеет несомненно и теоретический интерес. Всестороннее изучение представителей класса *Phycomycetes*, которые в большинстве своем являются водными грибами, проливает свет на вопросы филогении и эволюции не только грибов, но также помогает решить некоторые из этих вопросов для низших растений в целом. Тщательное исследование группы водных гифомицетов позволяет выявить у них ряд своеобразных морфологических, физиологических и биологических особенностей, являющихся результатом их приспособленности к условиям существования в водной среде. Наконец, водные грибы, принадлежа к разным в систематическом отношении группам, являются интересным сообществом разных микромицетов для раскрытия их экологических взаимосвязей с учетом физико-химических, гидрологических и биологических факторов, имеющих место в водоемах. Таким образом, тот большой теоретический и практический интерес, который представляет группа водных грибов, обуславливает необходимость дальнейшего углубленного исследования ее в водоемах Советского Союза.

Важным этапом в изучении водных грибов является выбор методов их сбора в водоемах, выделения и получения чистых культур. Успешное изучение видового состава этих грибов, их распространения в различных типах акваторий, расположенных в разных ботанико-географических районах, их взаимосвязей с окружающей водной средой и т. д. в значительной степени зависит от правильности выбора и совершенства примененных методов исследования. Тот факт, что водные грибы весьма гетерогенны как в отношении систематического состава, так и в отноше-

нии биологии и экологии, определяет и различие, и своеобразие методических подходов к изучению отдельных групп водных грибов. В связи со значительным разнообразием условий обитания в пресных и соленых (морских) водоемах в настоящее время общепризнано разделение водных грибов на две экологические подгруппы: грибы пресных и грибы соленых — морских и океанических — акваторий. И хотя исследованиями последних лет показано, что резкой границы между этими подгруппами водных грибов нет, а именно в эстуариях рек были обнаружены некоторые грибы, ранее относившиеся только к пресноводным организмам, однако методы сбора, выделения и культивирования пресноводных и морских грибов все же весьма существенно отличаются друг от друга. Поэтому методы изучения грибов, населяющих пресные и соленые (морские) водоемы, изложены раздельно в соответствующих главах книги.

Для успешного сбора, выделения и культивирования водных грибов немаловажным является знание их образа жизни в водоеме, в первую очередь способа питания, т. е. их приспособленности к сапрофитизму или к паразитизму. При сборе и выделении в чистую культуру водных грибов-сапрофитов, которые характеризуются широкой амплитудой приспособления к разным субстратам — источникам питания, применяются одни методы, при сборе и выделении в чистую культуру водных грибов-паразитов (в основном это облигатные паразиты или реже факультативные сапрофиты, т. е. грибы, стоящие на более высоких ступенях эволюции) применяются совершенно иные методы, в значительной степени зависящие от особенностей питательного субстрата — растения-хозяина или животного. В связи с такой спецификой методов исследования водных грибов в книге описываются отдельно основные методы изучения сапрофитных и паразитных грибов в пресных и морских водоемах. При этом также обращается внимание на некоторое своеобразие методов сбора, выделения и культивирования водных грибов, которое обусловлено принадлежностью их к той или иной систематической группе и определяется морфологическими, физиологическими и биологическими особенностями, свойственными данной группе микромицетов.

В первой главе книги, посвященной методам исследования грибов пресных водоемов, отдельно изложены также методы сбора, выделения и культивирования грибов сточных вод и загрязненных водоемов. Методы исследования этих грибов, представляющих собой как бы особую экологическую группировку внутри большой группы пресноводных грибов, весьма специфичны и требуют поэтому специального освещения.

В книге приведены все литературные источники, которые авторы использовали. Кроме того, в книге дается «Приложение», где сведены рецепты питательных сред, на которых грибы культивируются в лабораторных условиях. Иллюстративный материал

состоит из оригинального и заимствованного (с некоторыми изменениями), главным образом из книг: Селр К. *Flora CSR. Oomycetes*, I, 1959 и Johnson T. W., Jr., Sparrow F. K., Jr. *Fungi in oceans and estuaries*, 1961.

Цель настоящей книги — освещение современных приемов и методов исследования, позволяющих наиболее полно выявить и изучить видовой состав водных микроскопических грибов разных систематических групп, в обилии населяющих пресные и соленые водоемы (в частности, морские), проточные и стоячие, наземные и подземные.

Исследование грибов, обитающих в пресных водоемах

Изучение грибов, главным образом фикомицетов, в пресных водоемах было начато еще в конце XVIII в. К середине XIX в. уже было накоплено достаточно фактического материала для опубликования сводных монографических работ по отдельным группам грибов класса *Phycomycetes* (Pringsheim, 1859; Cornu, 1872; De Bary, 1881; Humphrey, 1893, и др.), представители которого составляют подавляющее большинство в микофлоре пресных водоемов. Исследования по систематике этих грибов осуществлялись параллельно с разработкой методов их изучения, в первую очередь способов сбора, а затем методов выделения в чистую культуру и выращивания в искусственных условиях. Этим объясняется тот факт, что методы сбора, выделения и культивирования многих групп фикомицетов из пресных водоемов разработаны более детально, чем для этих низших грибов, обитающих в морях и океанах, исследование которых было начато только в конце XIX в., или для пресноводных гифомицетов, к изучению которых приступили совсем недавно — лишь в 40-х годах XX в.

Следует отметить, что для обоих типов водоемов методы сбора, выделения и культивирования грибов-паразитов разработаны значительно слабее, чем подобные методы для грибов-сапрофитов. Причиной тому — трудности, возникающие при попытках выделить и культивировать на искусственных средах грибы — облигатные паразиты, для которых характерна узкая специализация по отношению к живому субстрату, т. е. к организму-хозяину. Водные грибы-сапрофиты, не имеющие столь строгой приуроченности к субстрату, легче поддаются выделению и культивированию на различных искусственных питательных средах. Для грибов-сапрофитов, обитающих в пресных водоемах разработаны некоторые общие методы сбора, выделения и культивирования, широко применяющиеся наряду со специальными методами исследования, предназначенными только для представителей определенных систематических групп.

Общие сведения о питательных средах для культивирования микроскопических грибов

Питательные среды делятся на среды неопределенного химического состава (природные субстраты) и среды определенного химического состава (синтетические), т. е. состоящие из различных химических веществ в точных весовых количествах.

Для нормального развития микроскопических грибов необходимо, чтобы питательная среда, на которой они культивируются, содержала бы ряд основных химических элементов (азот, углерод, натрий, серу, магний и др.). Важнейшими элементами питания грибов являются углерод и азот. Источником углерода служат органические вещества, из них наиболее усвояемы различные сахара. Источником азота могут быть как неорганические химические соединения, например азотнокислый натрий и азотнокислый аммоний и т. п., так и органические вещества, содержащие азот, как например аспарагиновая кислота, разные пептоны и т. п. Пептоны представляют собой смесь разнообразных полипептидов, включая высокомолекулярные, которые близки к белкам (табл. 1).

Таблица 1

Состав некоторых протеолизатов (по: Иерусалимский, 1963)

Препарат	Биуретовая реакция	Фракции, % к общему азоту		
		протеазная	пептонная	низкомолекулярная
Пептон «Фармакон» . .	+	63.5	9.7	27.8
Пептон «Витте»	+	44.1	26.7	29.2
Триптический протеолизат	+	2.0	14.9	83.1
Гидролизат желатины	—	0.0	0.0	100.0

Известный пептон американской фирмы Difco готовится путем кратковременного воздействия на белки пепсином, ферментом желудочного сока. Он содержит много высокомолекулярных пептидов. Обычный пептон состоит из более простых пептидов, полученных при более глубоком протеолизе. Под названием триптон фирма Difco выпускает продукт расщепления белков с помощью трипсина — фермента поджелудочной железы.

Питательные среды различаются между собой как в количественном, так и в качественном отношении по содержанию в них химических веществ. Для приготовления любой синтетической среды необходимо знать не только состав химических соединений, содержащихся в ней, но и их оптимальные и максимальные количества, в пределах которых вообще эти вещества используются в качестве питательных ингредиентов для грибов. То же относится и к полусинтетическим средам, состоящим из ряда чистых химических веществ и препаратов, изготовляемых из природных субстратов, как например, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина, печеночный экстракт и т. п., имеющих неопределенный химический состав.

Концентрация солей и микроэлементов в питательных средах для роста микроскопических грибов (г/л)

Соли:	Минимальное количество	Максимальное количество
K_2HPO_4	0.3—0.5	1.0—2.0
KH_2PO_4	0.3—0.5	1.0—2.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ *	0.1—0.2	0.3—0.5
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ **	0.003—0.01	0.02—0.1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.003—0.01	0.03—0.1
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.002—0.005	0.025—0.1

Микроэлементы:

$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (или $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$)	0.002—0.005	0.005—0.01
$CoCl_2$ ***	до 0.025	до 0.05
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ****	0.01—0.03	0.03—0.075
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.001—0.003	0.005—0.025

* Кристаллизуется с H_2O .
 ** Кристаллизуется с $5H_2O$ и H_2O .
 *** Кристаллизуется с $6H_2O$ и $2H_2O$.
 **** Кристаллизуется с $6H_2O$ и $4H_2O$.

В настоящее время список микроэлементов расширился и включает железо, цинк, медь, марганец, галлий, молибден и др.

Грибы для своего нормального развития, в особенности на синтетических средах, нуждаются в различных ростовых веществах, в частности витаминах (табл. 2). В питательные среды витамины вносятся в ничтожных количествах, и поэтому следует из исходных (маточных) растворов делать соответствующие разведения, соблюдая при этом правила асептики. Например, в 1 л питательной среды тиамин может быть от 10 до 100 мкг, а биотина только от 1 до 10 мкг.

Таблица 2

Количество витаминов используемых как факторы роста в синтетических питательных средах для культивирования микроскопических грибов

(по: Иерусалимский, 1949, 1963)

Вещество	Устойчивость к нагреванию в слабощелочной среде	Оптимальная дозировка, в мг/л
Биотин	+	0.001—0.01
Фолиевая кислота	—	0.0005—0.001
n-Аминобензойная кислота	+	0.0005—0.0015
Тиамин	—	0.01—0.1
Са-пантотенат	—	0.03—1.0
Пиридоксин	+	0.01—1.0
Рибофлавин	—	0.05—1.0
Никотиновая кислота	—	0.1—1.0

В сухом виде все витамины и витаминоподобные вещества сохраняются хорошо. Рибофлавин, пиридоксин и фолиевая кислота разрушаются от освещения. В водных растворах витамины менее устойчивы против действия кислорода, щелочей и продуктов метаболизма микробов, поэтому посуду предварительно стерилизуют и для растворения витаминов пользуются стерильной водой. Растворы более устойчивых к нагреванию витаминов стерилизуют в автоклаве, менее устойчивых — кипячением на водяной бане несколько раз. Очень удобно сохранять витамины не в водных, а в 70° спиртовых растворах. В этом случае стерильность наступает приблизительно через сутки; програвать в данном случае раствор не надо. Исходные растворы обычно готовят из расчета от 1 до 500 мг витамина на 1 л воды.

Вместо химически чистых витаминов можно пользоваться различными дрожжевыми препаратами (дрожжевым автолизатом, дрожжевым экстрактом и т. п.), которые богаты витаминами, особенно витаминами группы В.

Дрожжевой экстракт

Известны два способа приготовления жидкого экстракта.

1-й способ. 40 г прессованных или 10 г сухих дрожжей заливают 100 мл водопроводной воды и кипятят в течение 45 мин., затем оставляют в течение 12 час. в холодильнике. Отстоявшуюся жидкость (экстракт) декантируют и фильтруют через свечи Шамберлена. Перед посевом гриба стерильно вносят 5—10 мл дрожжевого экстракта в колбы, содержащие по 100 мл жидкой питательной среды.

2-й способ. 1 кг прессованных дрожжей размельчают и смешивают с 825 мл дистиллированной воды. Взвесь нагревают до 90—92° и сразу же фильтруют, сначала через складчатый бумажный фильтр, затем через фильтр Зейца. Для проверки на стерильность 2—3 мл дрожжевого экстракта засевают в 10 мл сахарного мясо-пептонного бульона и выдерживают в термостате 3 суток при 27—28°. Дрожжевой экстракт готовят впрок и хранят в холодильнике. На каждые 100 мл питательной среды берут 3—4 мл экстракта.

Казеиновый гидролизат

В круглодонную колбу вносят 20 г сухого казеина, заливают 100 мл 20%-й HCl и кипятят 8 час. с перерывами. После кипячения содержимое колбы переносят в выпарительную чашку и выпаривают на водяной бане 20—24 часа. Когда содержимое приобретает консистенцию сметаны, добавляют 75—100 мл дистиллированной воды и вновь продолжают выпаривание. Остаток (гидролизат) переносят в колбу, подщелачивают раствором едкого натра до pH 3.0 и добавляют дистиллированной воды до 200 мл. Затем в колбу прибавляют 4—5 г животного угля и содержимое колбы сначала прогревают при 60° в течение 1 часа, а затем кипятят в течение 5—6 мин., после чего фильтруют через складчатый бумажный фильтр и окончательно стерилизуют кипячением 30 мин. Полученный гидролизат хранят в холодильнике. Казеиновый гидролизат содержит различные аминокислоты, за исключением триптофана.

Дрожжевой автолизат

Применяется два способа его приготовления.

1-й способ. Смешивают 500 г свежих прессованных дрожжей с 500 мл воды, прокипяченной и остуженной до 60°. Смесь выдерживают 3—4 дня при 45—55°. Отделенный от жидкости клейкий трудно фильтрующийся осадок промывают 250 мл воды. Обе порции жидкости соединяют, стерилизуют 30 мин. в автоклаве при 105—110°. Затем жидкость фильтруют до получения полной прозрачности. Такой автолизат в количестве 10—20 мл добавляют на 1 л среды, а для многих водных грибов можно вносить всего 0.5—1.0 мл автолизата.

2-й с п о с о б. 1 кг прессованных дрожжей разводят в 3 л дистиллированной воды. Тщательно перемешивают до получения однородной взвеси, сливают в бутылки и ставят в термостат при температуре 50—55° на 36—48 час. Затем автоклавизируют в течение 15 мин. при температуре 120°. Через сутки автолизат разделяется на прозрачный слой и осадок, для сред употребляют прозрачный слой.

Дрожжевая вода

Смешивают 100 г свежих прессованных дрожжей с 1 л водопроводной воды, кипятят в течение 20—30 мин., затем дают отстояться на холоде. Верхний прозрачный слой сливают, остаток фильтруют через бумажный фильтр. К фильтрату прибавляют водопроводной воды до прежнего объема. Стерилизуют в автоклаве при 0.5 атм. в течение 25 мин.

Прессованные дрожжи можно заменить высушенными (20 г на 1 л воды). На 100 мл среды вносят 5—10 мл дрожжевой воды.

Печеночный экстракт и бульон

Свежую печень рогатого скота освобождают от пленок и жира, пропускают через мясорубку. Фарш заливают водой (1:2) и оставляют на холоду в течение 2—2.5 час., затем кипятят 1 час и фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Из полученного фильтрата можно получить печеночный экстракт (жидкий или сухой) и печеночный бульон.

Для получения жидкого печеночного экстракта следует восстановить прежний объем фильтрата добавлением воды и подвергнуть его стерилизации в автоклаве при 110° 30 мин. (рН 6.8—7.0). Для получения сухого препарата печеночного экстракта фильтрат следует подвергнуть обезвоживанию.

Для приготовления печеночного бульона к фильтрату следует прибавить равное количество водопроводной воды, 1% пептона и 0.5% поваренной соли и подвергнуть автоклавированию при 110° в течение 30 мин.

Состав некоторых специальных препаратов для питательных сред, изготавливаемых фирмой Difco *

Bacto-liver (Difco, B133) — обезвоженный препарат, приготовленный из свежей бычьей печени. 135 г препарата эквивалентны 500 г свежей печени. Из препарата готовят среду из расчета 50—70 г на 1 л дистиллированной воды. Ее сначала нагревают до 50° и выдерживают при данной температуре в течение 1 часа, периодически взбалтывая, затем вновь нагревают до кипения и кипятят несколько минут до заметного свертывания в ней различных протеинов и, наконец, фильтруют. К фильтрату добавляют другие ингредиенты питательной среды (соли, пептон и др.), кратковременно кипятят и снова фильтруют, после чего разливают по пробиркам и колбочкам и стерилизуют в автоклаве.

Bacto-soytone (Difco, B346). Препарат представляет собой энзиматический гидролизат муки соевых бобов (соевый пептон); содержит различные углеводные продукты расщепления растительного белка соевых бобов.

Bacto-casamino acid (Difco, B230). Сухой препарат представляет собой смесь различных аминокислот, полученных в результате полного гидролиза казеина. Используется как источник органического азота при приготовлении питательных сред.

Bacto-vitamin free casamino acid. Этот сухой препарат как и предыдущий представляет собой смесь аминокислот, но очищенную от всякой примеси

* Difco manual of dehydrated culture media and reagents microbiological and clinical laboratory procedures, 9 ed. Detroit, Michigan, 1971.

витаминов. Гидролизат казеина освобождается от витаминов обычно с помощью активированного угля и других адсорбентов. Порошок легко растворим в воде.

Bacto-oxgall (Difco, B128). Препарат представляет собой обезвоженную бычью желчь. Эквивалентом свежей желчи является 10%-й раствор препарата. Применяется для приготовления среды Литтмана (стр. 59).

Bacto-yeast extract (Difco, B127) — порошок, полученный путем обезвоживания фильтрата дрожжевого автолизата (т. е. путем вакуумной сушки прозрачного слоя фильтрата отделенного от осадка). Применяется при приготовлении сред в количестве 0.3—0.5% (способы приготовления дрожжевого автолизата — стр. 11).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕСНОВОДНЫХ ГРИБОВ-САПРОФИТОВ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО СБОРУ, ВЫДЕЛЕНИЮ И КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ГРИБОВ-САПРОФИТОВ ИЗ КЛАССА PHYCOMYCETES

Сбор. Водные фикомицеты-сапрофиты развиваются на широком наборе субстратов растительного и животного происхождения, погруженных в воду пресных водоемов различного типа. На основе обследования субстратов, на которых в природе развиваются сапрофитные фикомицеты из разных порядков, семейств и родов, был разработан общий метод их сбора, известный как метод «приманок».

Метод приманок заключается в том, что определенный субстрат (приманку), являющийся наиболее подходящим для развития водных фикомицетов из той или иной систематической группы, погружают в приборе специальной конструкции на определенную глубину в водоем и выдерживают там до тех пор, пока на поверхности приманки не появится мицелий или не образуются пустулы грибов (рис. 1). Иногда приманку погружают не непосредственно в водоем, а в пробу воды, отобранную из исследуемого водоема и налитую в чашку Петри или кристаллизатор. В качестве приманок для улавливания водных фикомицетов используют яблоки, груши, плоды шиповника, сливы, помидоры, ветви различных пород деревьев, семена конопли, льна, пыльца растений, остатки мертвых насекомых, целлофан и т. д. Хотя строгой специализации по отношению к субстратам у водных фикомицетов-сапрофитов из разных систематических групп в большинстве случаев не наблюдается, однако определенная приуроченность представителей разных порядков к тем или иным субстратам все же имеется. Так, представители пор. *Chytridiales* развиваются преимущественно на таких приманках, как пыльцевые зерна, листья злаков, остатки мертвых насекомых; представители пор. *Blastocladales* — на плодах различных растений; для представителей пор. *Saprolegniales* лучшей приманкой являются семена конопли.

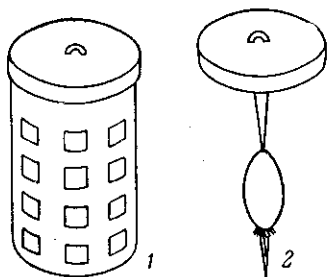


Рис. 1. Прибор для погружения приманок в водоем.

1 — общий вид прибора; 2 — крышка прибора с металлическим стержнем, на который в качестве приманки наизнанку насажен плод шиповника.

Метод приманок впервые был применен для сбора сапрофитных фикомицетов Такстером (Thaxter, 1890, цит. по: Emerson, Cantino, 1948). С тех пор этот метод является наиболее распространенным для сбора этих грибов наряду с непо-

средственным сбором природных субстратов, пораженных грибами, из водоемов с последующей их микроскопией.

Для погружения приманок в водоем разработаны приспособления различной конструкции. Наиболее примитивное приспособление представляет собой изогнутую в виде буквы V проволоку, на которую нанизывают приманки (Sparrow, 1933). Чаще приспособления сконструированы так, чтобы приманка, будучи защищенной от поедания водными насекомыми и моллюсками, в то же время подвергалась постоянному воздействию воды. Удобными для такой цели являются небольшие корзиночки из проволоки с крышками. Приманку или непосредственно помещают в такую корзиночку (Emerson, Cantino, 1948; Cantino, 1949), или сначала в мешочек из кисеи или газа, а затем в корзиночку (Haskins, 1946). Иногда приманки погружают в водоем в мешочках из нейлона (Höhnk, Bock, 1954). Для погружения приманок в водоем используют также целлулоидные коробки или металлические цилиндры с большим количеством отверстий в стенках (Willoughby, 1959a; Perrott, 1960a). Кук и Бартч (Cooke, Bartsch, 1959, 1960) предлагают приспособления для приманок в виде цилиндров, сделанных из материала, который употребляется для изготовления сит. С обоих концов такой цилиндр закупоривается корковыми пробками, от одной из них в полость цилиндра отходит стальной стержень, на который нанизывается приманка. Приспособления всех типов перед погружением их в водоем закрепляют с помощью прочных нейлоновых ниток, капроновой лески на берегу или прикрепляют к буйку, а к их дну присоединяют груз.

Выделение и выращивание чистой культуры. Приманку извлекают из водоема через 2—4 недели, а если она была погружена в пробу воды в чашке Петри или кристаллизаторе и находилась в лаборатории, то через несколько дней, а иногда и раньше, и исследуют под микроскопом на наличие водных фикомицетов. Выделение чистых культур этих грибов производится общепринятыми методами: изоляцией либо отдельных зооспор, либо отдельной гифы гриба и последующим помещением их на питательную среду. Обычно в результате первичного посева удается

получить «грубые» (смешанные) культуры (gross culture), содержащие не один, а два, иногда три вида грибов, и, кроме того, бактерии. Следующим этапом является выделение из смешанной культуры на искусственную питательную среду одновидовой грибной культуры, которую затем путем многократных пересевов на чистые среды, применяя при этом специальные способы и средства подавления разных форм бактерий, освобождают от сопутствующей бактериальной флоры.

При первичном выделении водных фикомицетов необходимо учитывать ряд общих положений (Sparrow, 1960): 1) водные фикомицеты могут существовать только при определенной и довольно ограниченной концентрации водородных ионов в среде; 2) для питания их, кроме минеральных компонентов, включая различные источники азота, необходимы также органические источники углерода и ростовые вещества; 3) зооспоры водных фикомицетов легко могут быть повреждены и даже убиты, если общая осмотическая концентрация среды высока; 4) гриб в процессе жизнедеятельности сам может продуцировать вещества, которые, накапливаясь, становятся ядовитыми и задерживают дальнейшее его развитие.

Исходя из этих общих положений, подбираются и условия культивирования водных фикомицетов-сапрофитов, и в первую очередь питательные среды для них. Питательные среды в большинстве случаев специфичны для отдельных групп, родов и даже видов водных фикомицетов; в особенности это касается грибов из порядка *Chytridiales*, где нередко для каждого вида необходимо подбирать соответствующие компоненты питательной среды.

Питательные среды.* Известно несколько питательных сред неопределенного химического состава, которые с успехом используются для культивирования водных фикомицетов-сапрофитов из разных порядков. К числу этих сред относятся следующие.

Yeast-starch (YpSs) — крахмало-дрожжевая среда, в состав которой входят: порошковидный дрожжевой экстракт (Difco) — 4.0 г, растворимый крахмал — 15.0 г, KH_2PO_4 — 1.0 г и $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5 г на 1 л воды.

Yeast-glucose (YpG) — глюкозо-дрожжевая среда в двух вариантах: 1) имеет такой же состав, как и YpSs, но только растворимый крахмал заменен глюкозой (20.0 г); 2) состав второго: порошкообразный дрожжевой экстракт — 1.0 г, глюкоза — 3.0 г, KH_2PO_4 — 1.4 г, Na_2HPO_4 — 0.6 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1 г и 0.04%-й водный раствор бромкрезола пурпурового — 5.0 мл, все на 1 л воды.

Tryptone-glucose (TG) — триптоно-глюкозная среда: порошковидный триптон (Difco) — 10.0 г, глюкоза — 10.0 г на 1 л воды.

* В процессе приготовления сред часто изменяют количественное соотношение между отдельными компонентами.

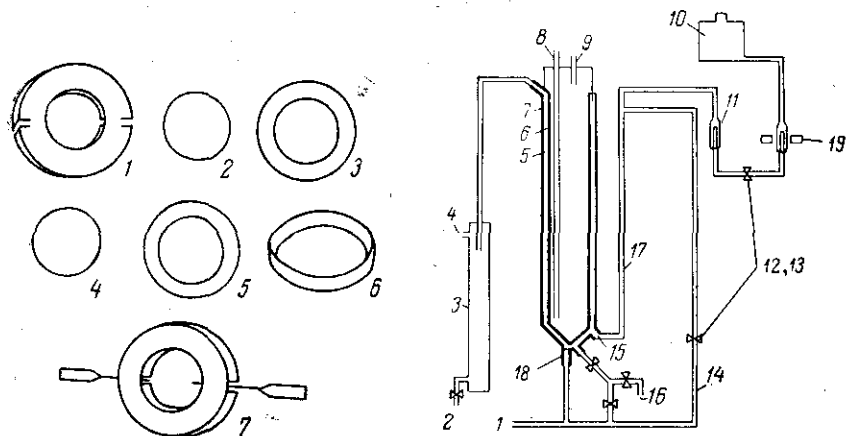


Рис. 2. Перфузионная камера для культивирования водных фикомицетов.

1 — верхняя металлическая часть камеры; 2 — верхняя стеклянная прокладка; 3 — силистиковая прокладка, через которую вводится шприц с питательной средой; 4 — нижняя стеклянная прокладка; 5 — металлическое поддерживающее кольцо; 6 — нижняя металлическая часть камеры; 7 — общий вид камеры со шприцами, с помощью которых внутрь камеры подается питательная среда.

Рис. 3. Схема аппарата Гриффина для продолжительного культивирования водных фикомицетов.

1 — источник воздуха; 2 — трубка для отвода культуры; 3 — градуированный цилиндр; 4 — трубка для отвода газов; 5 — культура; 6 — внутренняя часть трубки; 7 — внешняя стенка трубки; 8 — ввод в водяную баню; 9 — вывод из водяной бани; 10 — сосуд для среды; 11 — контрольный клапан; 12, 13 — зажимы; 14 — трубка для поступления воздуха; 15 — ввод для среды; 16 — вывод для среды; 17 — трубка для поступления среды; 18 — разбрызгиватель; 19 — соленоидный клапан.

Peptone-glucose (PG) — пептоно-глюкозная среда; порошковый пептон (Difco) — 10.0 г, глюкоза 10.0 г на 1 л воды.

Corn-meal (BBL)* — агар с кукурузной мукой: 2—4 ложки кукурузной муки на 1 л воды (слегка нагревают на водяной бане при 60° в течение часа, затем жидкость отфильтровывают, добавляют воды до 1 л) и 2% агара (Emerson, 1958).

Выделение чистой культуры из зооспор. Зооспоры фикомицетов, которые могут быть использованы для выделения культур этих грибов на питательных средах, находятся в воде водоемов в сравнительно невысокой концентрации. Поэтому при посеве проб воды на питательные среды только в редких случаях можно получить положительный результат. Для получения чистых культур водных фикомицетов необходимо в пробах воды, высеваемых на питательную среду, увеличивать концентрацию зооспор и других грибных зародышей путем длительного потокового центрифугирования большого количества воды (Fuller,

* Baltimore biological laboratory.

Poytton, 1964). Другой способ увеличения концентрации зооспор и грибных зачатков в воде заключается в фильтровании литровых проб воды на специальной фильтровальной установке Millipore (Miller, 1967). Для выделения чистых культур водных фикомицетов в первом случае используют центрифугат (0.2 мл), а во втором — фильтрат (0.5 мл), которые наносятся на питательную среду.

Приспособления для наблюдения за развитием гриба в искусственных условиях. Многие водные фикомицеты имеют сложный, состоящий из нескольких стадий, цикл развития; у некоторых представителей этой группы известно чередование поколений. Эти особенности развития водных фикомицетов в ряде случаев обуславливают необходимость весьма продолжительного культивирования для успешной идентификации их видовой принадлежности. Наблюдения за развитием водных фикомицетов при строго контролируемых условиях среды возможно осуществить, пользуясь перфузионной камерой (рис. 2) для культуры животных тканей (Salkin, Robertson, 1970). Микрокамера ограничена двумя стеклами, закрывающими отверстия в нижней и верхней стальной частях, через которые внутрь камеры вводятся стерильные иглы шприцев, подающих питательную среду. Гриффин (Griffin, 1965) предложил специальный аппарат для длительного культивирования водных фикомицетов (рис. 3).

Таковы общие методические указания к сбору, выделению и культивированию водных фикомицетов-сапрофитов.

Специфика методов сбора, выделения и культивирования водных сапрофитных фикомицетов в значительной степени определяется морфологией, физиологией, биологией и экологией грибов каждого порядка этого класса.

Грибы порядков *Chytridiales* и *Hyphochytriales* (рис. 4, 5)

Хитридиальные грибы (*Chytridiales*) пресных водоемов характеризуются микроскопическим, исключительно простого строения талломом, но в большинстве случаев снабженным развитой системой ризоидов; для представителей этого порядка характерно наличие зооспор с одним задним жгутиком. По строению таллома с хитридиальными грибами весьма сходны грибные организмы, которые раньше рассматривали в пределах пор. *Chytridiales* (Sparrow, 1943), а впоследствии на основании наличия у них зооспор с одним передним жгутиком выделили в самостоятельный порядок *Hyphochytriales* (Sparrow, 1960). Учитывая морфологическое сходство представителей этих порядков, одинаковые условия их местообитания и тождественность методов сбора, выделения и культивирования, рассмотрим сведения о методах исследования хитридиальных и гиофохитриальных грибов со-

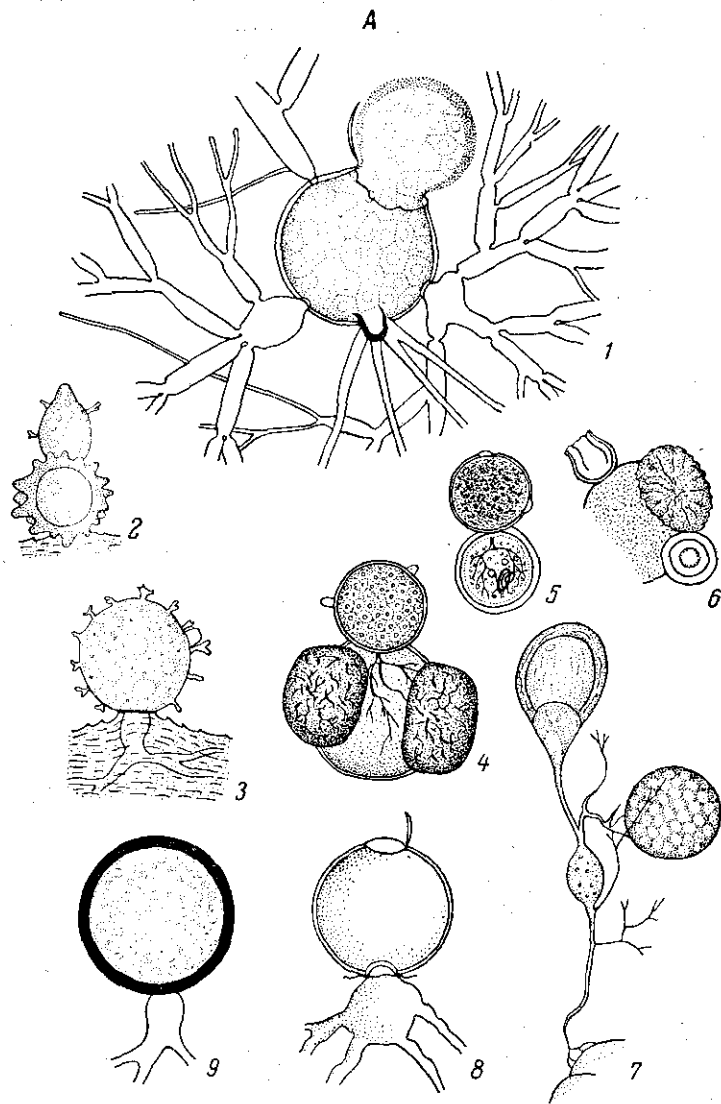


Рис. 4. Грибы пор. Chytridiales.

А: 1 — *Truittella setifera*, центральный оперкулярный (покрышечный) спорангий и разветвленные ризоиды; 2, 3 — *Rhizophydium keratinophilum*: 2 — прорастание покоящейся споры, 3 — зрелый спорангий; 4, 5 — *Rhizophydium sphaerotheca*: 4 — зрелый спорангий на пыльце сосны, 5 — спорангий на *Isoetes*; 6 — *Rhizophydium pollinis-pini* на пыльце сосны (сверху слева опустошенный спорангий, снизу покоящаяся спора); 7 — *Physocladia obscura* — пролиферация спорангия; 8, 9 — *Chytromyces aureus*: 8 — опустошенный эпibiотический спорангий, 9 — эпibiотическая покоящаяся спора.

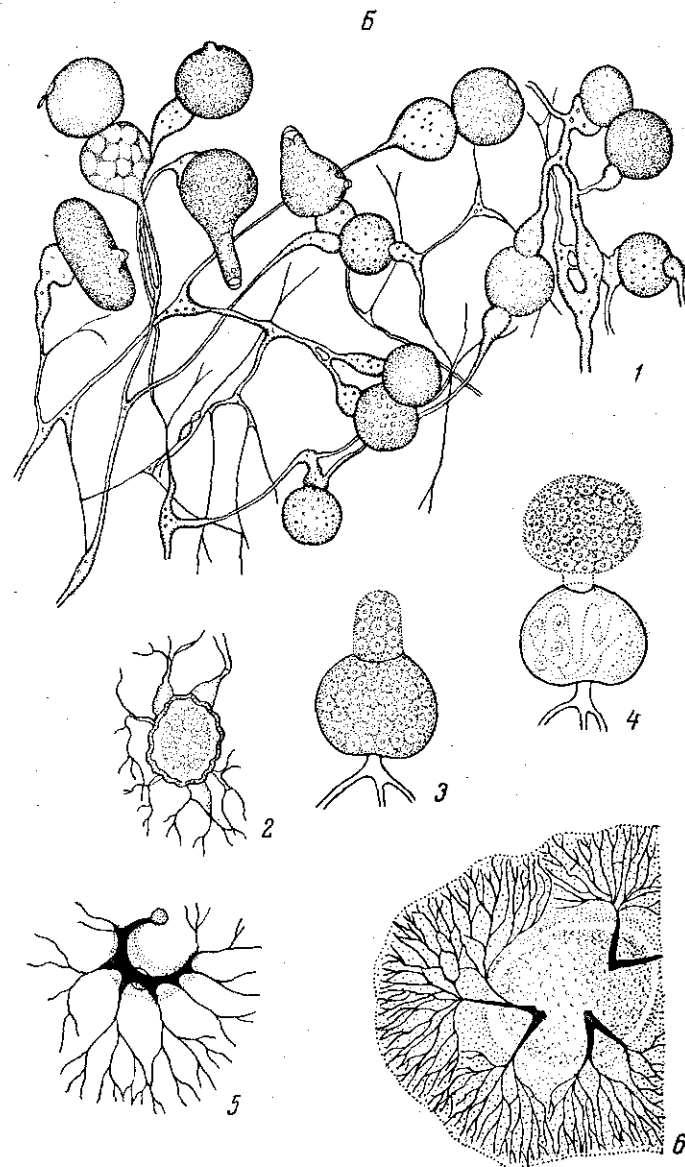


Рис. 4 (продолжение).

Б: 1 — *Nowakowskiella elegans*, экстрамитохондриальная часть полицентрического гриба; 2, 5, 6 — *Phlyctothiza endogena*: 2 — покоящаяся спора с ризоидами, 5 — начальная стадия развития ризоидов, 6 — зооспоры в зрелом спорангии; 3, 4 — *Rhizidium ramosum*, две стадии высвобождения зооспор из спорангия.

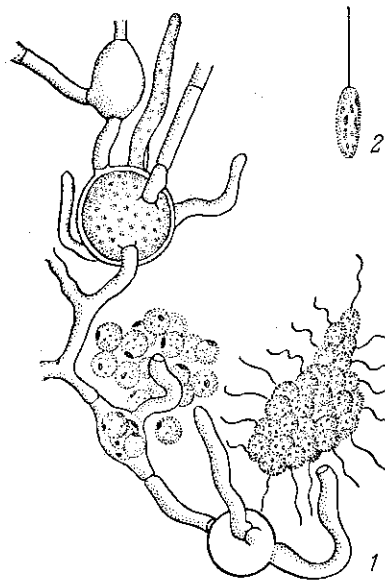


Рис. 5. Гриб *Hyphochytrium catenoides* (пор. *Hyphochytriales*).

1 — часть таллома с зооспорами у выхода выводного канала (спorangии с выводными каналами и опустошенные спорангии); 2 — переднежутиковая зооспора.

вместно, тем более что данные о методах изучения последней группы весьма малочисленны.

Сбор. В пресных водоемах представители хитридиальных и гиfoxитриальных грибов ведут как паразитный, так и сапрофитный образ жизни, причем виды, относящиеся к этим двум группам, в большинстве случаев в равном соотношении представлены во всех семействах порядков *Chytridiales* и *Hyphochytriales*. Среди этих грибов наряду с облигатными паразитами, развивающимися

преимущественно на водорослях, реже на водных грибах и беспозвоночных животных, в изобилии встречаются факультативные паразиты и облигатные сапрофиты. Сапрофиты развиваются на различных погруженных в воду остатках растительного и животного происхождения, в том числе на гниющих частях растений, на трупах водных и наземных насекомых и их личинок, на других природных субстратах, содержащих кератин, хитин и целлюлозу. Обнаружение хитридиальных и гиfoxитриальных грибов-сапрофитов в исследуемых водоемах проводят либо путем непосредственного сбора и последующего микроскопирования вышеуказанных субстратов, либо путем применения метода приманок.

В качестве приманок для улавливания хитридиальных и гиfoxитриальных грибов широко используются зерна пыльцы различных растений, в первую очередь сосны (*Pinus spp.*), ели (*Picea spp.*), кедра (*Cedrus*) и других пород, иногда травянистых растений из сем. *Gramineae*, *Compositae*, *Malvaceae*; листья культурных и диких злаков — пшеницы, кукурузы, ржи, ячменя, мятлика, полевицы и других, обычно обесцвеченные, лишенные хлорофилла выдерживанием в абсолютном спирте с последующим кипячением в воде (Willoughby, 1956); прокипяченные половинки семян конопли и кунжута; чешуйки лука; редко плоды; фильтровальная бумага; целлофан, а также субстраты животного происхождения: ногти, рога, перья, хитин и некоторые другие (Berdan, 1939, 1941; Cox, 1939; Haskins, 1939, 1946; Ward, 1939b; Whiffen, 1941a; Karling, 1942, 1945, 1968, 1969; Ajello, 1948a, 1948b; Antikajian, 1949; Reinboldt, 1951; Rothwell, 1956;

Willoughby, 1956, 1959a, 1961a, 1961b, 1968; Sparrow, 1957; Emerson, 1958; Fuller, Barshad, 1960; Umphlett, Holland, 1960; Goldstein, 1961; Paterson, 1967; Schmitt, 1967; Bostick, 1968; Johnson, 1968; Dogma, 1969; Howard, Johnson, 1969; Barr, 1970a; Klavness, 1970; Salkin, 1970, и мн. др.). Иногда для выявления хитридиальных грибов приманки в приспособлениях специальной конструкции погружают в исследуемый водоем (Haskins, 1946; Willoughby, 1959a; Paterson, 1967). Однако чаще приманки помещают непосредственно в пробу воды, отобранную из водоема и доставленную в лабораторию. В водоем приманки погружают на 1—3 недели, в лаборатории на приманках в пробах воды развитие хитридиальных грибов происходит гораздо быстрее (иногда за несколько дней). Если при микроскопировании приманок на них обнаруживают таллом хитридиального гриба, то следующим этапом исследования после его идентификации должно быть выделение на искусственную питательную среду с целью получения чистых культур.

Получение чистой культуры.* Получению чистых культур хитридиальных грибов-сапрофитов уделялось большое внимание с самого начала изучения этой группы грибов. Суммируя опыт своих предшественников, пытавшихся получить чистые культуры представителей пор. *Chytridiales*, Коуч (Couch, 1939) разработал шесть основных способов выделения хитридиальных грибов для получения их чистых культур. Приманку с хитридиальным грибом, тщательно промытую в стерильной воде, профильтрованную через древесный или животный уголь, в зависимости от способа выделения гриба переносят в чашку Петри с агаром, на предметное стекло или в чашку Петри со стерильной дистиллированной водой и приступают к получению чистых культур одним из следующих 6 способов.

С п о с о б 1. Выделение одного спорангия гриба производится в чашке Петри, на дно которой наносят на расстоянии 1 см друг от друга две капли стерильной воды. В одну из них помещают маленький кусочек тщательно промытого субстрата с хитридиальным грибом, в другую — кусочек стерильного листа кукурузы или пшеницы. Под биноклем (увел. 10—100) препаративной иглой осторожно отделяют маленький кусочек субстрата, к которому прикреплен только один спорангий гриба, и этот кусочек переносят в каплю воды со свежим стерильным субстратом. Затем один, выделенный таким образом спорангий, вместе с новым субстратом переносят в другую чашку Петри в каплю стерильной воды. В новой чашке, для того чтобы предотвратить высыхание капли со спорангием, создают условия влажной камеры, нанося на дно и на крышку чашки капли стерильной дистиллированной воды.

Этот способ пригоден для выделения чистых культур хитридиальных грибов, имеющих спорангии большого размера.

С п о с о б 2. Выделение одного спорангия гриба на агаре производится следующим образом. Из субстрата с хитридиальным грибом на пластинке с 3%-м агаром острой иглой под биноклем отделяют один спорангий,

* Стерильная вода, используемая при выделении чистых культур хитридиальных грибов, обязательно обрабатывается древесным или животным углем.

протягивают его по поверхности агара, чтобы освободить от бактериального загрязнения; убедившись путем микроскопирования, что отделен действительно один спорангий, вырезают его вместе с кусочком агара и переносят в стерильную чашку Петри в каплю воды со свежим субстратом — кусочком листа растения. Этот метод применяется для выделения чистых культур хитридиальных грибов с небольшими спорангиями, особенно в том случае, если на субстрате развивается одновременно несколько видов грибов из этой группы.

Способ 3. Выделение спор из одного спорангия на предметном стекле производят в том случае, если на субстрате развивается одновременно несколько видов хитридиальных грибов, причем у выделяемого вида имеется сложная система ризоидов. Созревший спорангий выделяют первым или вторым способом на стерильное предметное стекло в каплю воды и наблюдают под микроскопом за выходом зооспор. В момент выхода их собирают в капиллярную пипетку и переносят в стерильную чашку Петри с каплей воды и свежим кусочком листа.

Способ 4. Если используется очень тонкая капиллярная пипетка и при выходе зооспор их отбирают в пипетку всего лишь несколько, то путем разведения этой концентрации зооспор в последовательных стерильных каплях воды, можно получить одну зооспору в капиллярной пипетке. Эту зооспору переносят в каплю стерильной воды с кусочком листа.

Ни один из этих способов (1—4) не гарантирует получения безбактериальной культуры. Для получения таких чистых культур предлагается два следующих способа (5 и 6).

Способ 5. Зооспоры хитридиальных грибов высеваются штриховым посевом на чашки Петри, содержащие одну из следующих сред: а) 3%-й голодный агар; б) агар Лейтнера № 12 — 2% агара и 0.004% пептона; в) агар Фоуста № 13 — 2% агара, 0.15% мальтозы и 0.004% пептона; г) агар с кукурузной мукой. Прорастание зооспор на этих питательных средах происходит за 12—24 часа. Этот процесс контролируют под биноклем, вырезают небольшой кубик агара с проросшей спорой и переносят в стерильную чашку Петри с каплей воды и кусочком листа.

Способ 6. Этот способ получения безбактериальных культур пригоден только для полицентрических хитридиальных грибов, споры которых, прорастая на агаре, образуют хорошо заметный мицелий. Вырезают кусочек агара с одной или несколькими нитями мицелия и переносят в чашку Петри с каплей стерильной воды и кусочком листа.

Хотя все вышеизложенные способы выделения чистых культур хитридиальных грибов вполне пригодны для получения таких культур на жидких и твердых искусственных питательных средах, сам Коуч получал чистые культуры этих грибов только на естественных субстратах, таких как листья кукурузы, пшеницы и других злаков.

Применение разработанных Коучем (Couch, 1939) способов выделения чистых культур хитридиальных грибов для выращивания их на искусственных питательных средах дает положительные результаты. Если до 1948 г. в чистую культуру было выделено только 10 видов хитридиальных грибов (Ajello, 1948b), то в настоящее время их насчитывается несколько десятков.

Культивирование. Еще в 1931 г., а затем в 1935 г. хитридиальный гриб *Cladochytrium replicatum* был выращен на агаре с кукурузной мукой (Sparrow, 1931a) и на нескольких других питательных средах, из которых наиболее благоприятной оказался почвенно-маннитный агар (Karling, 1935a). И хотя полученные культуры не были абсолютно чистыми, была доказана воз-

можность выращивания хитридиальных грибов на искусственных питательных средах.

Питательные среды. Наиболее распространенными средами неопределенного химического состава для выделения и культивирования хитридиальных грибов являются агар с кукурузной мукой (Sparrow, 1931a; Ward, 1939b; Berdan, 1941; Crasemann, 1954; Willoughby, 1959a; Salkin, 1970) и особенно среда YpSs (Crasemann, 1954; Koch, 1957; Emerson, 1958; Willoughby, 1958, 1959a, 1961a, 1962a; Paterson, 1962; Barr, 1970a; Salkin, 1970). Среда YpSs (стр. 15) применяется также для выделения и культивирования представителей пор. *Hyphochytriales* (Fuller, Barshad, 1960; Fuller, 1962). Для хитридиальных грибов используются более слабые концентрации питательных веществ, чем те, которые входят обычно в состав среды YpSs, т. е. $1/2$, $1/4$ и даже $1/8$ часть всех веществ, содержащихся в среде YpSs. Довольно широко применяется для выделения и культивирования хитридиальных грибов 2%-й хитиновый агар (Karling, 1945, 1966a, 1969; Antikajian, 1949). Позднее для выращивания хитридиальных грибов была предложена хитиносодержащая среда, в состав которой кроме обработанного хитина входят дрожжевой экстракт, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, KH_2PO_4 , виннокислая соль железа и набор микроэлементов ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, H_3BO_3 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$); pH среды 6.5 (Reisert, Fuller, 1962).

Реже хитридиальные грибы культивируют на таких средах неопределенного химического состава, как 0.5%-й голодный агар (Cox, 1939), агаризованные (1.5%) среды: 1) с глюкозой (1.0%) или же с глюкозой и пептоном (Berdan, 1941; Emerson, 1958); 2) с пептоном, дрожжевым экстрактом и декстрозой (Ajello, 1948b; Antikajian, 1949); 3) с пептоном, дрожжевым экстрактом и глюкозой (Koch, 1957); 4) с пептоном, декстрозой и пшеничной мукой (Bostick, 1968). Среда с пептоном, дрожжевым экстрактом и глюкозой используется для культивирования гиофохитриальных грибов (Barr, 1970a). Иногда культуры представителей пор. *Chytridiales* получают на жидких средах неопределенного химического состава: 1) на 0.5%-м гристонном бульоне (Crasemann, 1954); 2) на среде, содержащей пептон — 50 мг, декстрозу — 9.0 г, агар — 9.0 г и 900 мл картофельного отвара, приготовленного путем кипячения 150 г нарезанных кубиками клубней картофеля в 1 л воды в течение часа (Koch, 1957), или 3) на среде с дрожжевым экстрактом (1%), пептоном (1%) и растворимым крахмалом (5%) на 1 л воды (Barr, 1970a). Ряд сред, предложенных для культивирования хитридиальных грибов, имеет более сложный состав, хотя они не являются еще синтетическими. К числу таких сред принадлежат: 1) среда, состоящая из гидролизата казеина — 0.3%, дрожжевого экстракта — 0.1%, глюкозы — 0.5%, KH_2PO_4 — 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.02% и Na_2HPO_4 — 0.06% (Rothwell, 1956); 2) среда, состоящая из дрожжевого экстракта, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,

тиамина, биотина и микроэлементов — $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Willoughby, 1959a) или 3) из раствора микроэлементов по прописи Уиффен (Whiffen, 1941b) (см. Приложение, табл. 1) в сочетании с 1% глюкозы и 0.1% дрожжевого экстракта (Willoughby, 1962a). Особенно сложный состав имеет неопределенная химическая среда, предложенная Гольдштейном (Goldstein, 1960a, 1961) и им же модифицированная. Помимо глюкозы — 5.0 г, триптона — 4.0 г, дрожжевого экстракта — 1.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5 г, K_2HPO_4 — 1.0 г в среду входит 5 мл одного раствора минеральных веществ (А) и по 1 мл двух других растворов (Б, В) на 993 мл воды; среда готовится с агаром (8.0 г) и без него. Первый раствор минеральных веществ (раствор А) состоит из H_3PO_4 — 6.0 мг, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 19.0 мг, $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 5.0 мг, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 50.0 мг и $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 79.0 мг на 100 мл воды; второй (раствор Б) — из $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.2 г на 100 мл воды и третий (раствор В) — из CaCl_2 — 1.0 г на 100 мл воды.

В настоящее время для культивирования хитридиальных и гиофохитриальных грибов разработаны довольно многочисленные синтетические среды. Основные из них приведены в табл. 1. Кроме сред, указанных в таблице, для культивирования хитридиальных грибов применяется также синтетическая среда Станьера (Stanier, 1942; Bernstein, 1968), в состав которой входят K_2HPO_4 — 1.0 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.2 г, NaCl — 0.1 г, CaCl_2 — 0.1 г, FeCl_2 — 0.02 г, глюкоза — 5.0 г и агар — 15.0 г на 1 л воды, и среда Уиллоуби (Willoughby, 1959b, 1962a), жидкая упрощенная синтетическая среда, основными компонентами которой являются глюкоза, NH_4Cl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и KH_2PO_4 , и, кроме того, входят тиамин и микроэлементы. Для культивирования хитридиальных и гиофохитриальных грибов используют синтетическую среду Крейсманна (Crasemann, 1954; Fuller, 1962), в состав которой помимо обычных компонентов (глюкозы, KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , тиамина) входят также лишенная витаминов смесь аминокислот из гидролизата казеина и виннокислая соль железа.

Условия культивирования представителей порядков *Chytridiales* и *Hyphochytriales* весьма разнообразны, однако в большинстве случаев культуры этих грибов и на твердых, и на жидких средах выращивают стационарно. Оптимальная температура для культивирования грибов на твердых и жидких искусственных средах 20—25° (Ajello, 1948b; Fuller, Barshad, 1960; Goldstein, 1960a, 1961; Fuller, 1962; Willoughby, 1962a; Bernstein, 1968; Barr, 1970a, 1970b). Для культивирования некоторых видов грибов из пор. *Chytridiales* более благоприятными являются температуры 15—20° (Goldstein, 1960a, 1961; Bostick, 1968; Barr, 1970b). Освещение культур обычно не имеет существенного значения, но иногда оптимальные условия для роста определенных видов хитридиальных грибов наблюдаются при выращивании их в темноте

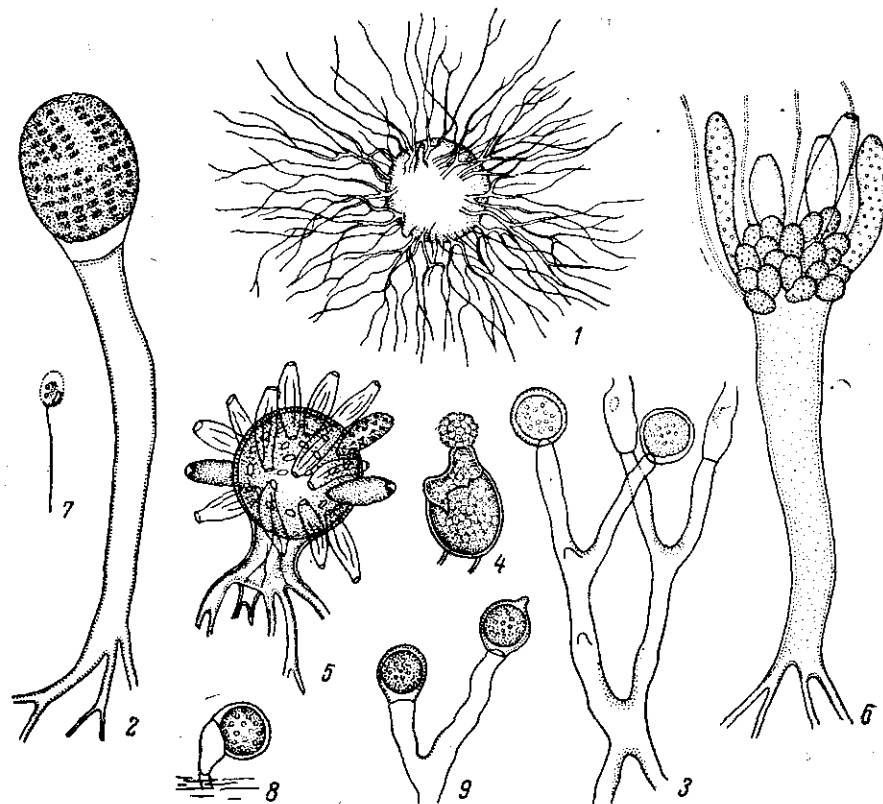


Рис. 6. Грибы пор. *Blastocladales*.

1 — *Blastocladia stubenii*, зрелый спорангий с двумя маленькими выводными каналами (сосочками); 2, 7 — *Blastocladia simplex*: 2 — покоящаяся спора, 7 — зооспора; 3, 4, 8, 9 — *Blastocladopsis parva*: 3 — таллом гриба с двумя покоящимися спорами и с двумя опустошенными спорангиями, 4 — проросшая покоящаяся спора и зооспора, 8 — базальная клетка и покоящаяся спора, 9 — покоящиеся споры, расположенные дихотомично; 5 — *Blastocladia globosa*, сферическая базальная клетка и расположенные на ней многочисленные спорангии; 6 — *Blastocladia pringsheimii*, спорангии и покоящиеся споры.

(Goldstein, 1960a), а иногда при круглосуточном искусственном освещении (Bernstein, 1968). В ряде случаев рекомендуется аэрация культур хитридиальных грибов (Bostick, 1968).

Грибы пор. *Blastocladales* (рис. 6)

Среди представителей этого порядка по образу жизни в естественных условиях различают три группы видов: облигатные паразиты (сем. *Coelomomycetaceae*), факультативные паразиты и сапрофиты (сем. *Catenariaceae*) и облигатные сапрофиты (сем.

Blastocladiaceae). С учетом образа жизни этих грибов и применяются определенные методы их сбора и последующего исследования.

Сбор. Для сбора бластокладидальных грибов-сапрофитов широко применяют приманки, которые погружают как непосредственно в исследуемый водоем, так и в пробы воды, отобранные из водоема. Для выделения грибов из рода *Blastocladia* в качестве приманок в водоем погружают незрелые яблоки, груши, а также сливы, шиповник, бананы, помидоры, клубни топинамбура и т. д. (Kanouse, 1925, 1927a; Sparrow, 1936, 1960; Blackwell, 1937, 1940; Lloyd, 1938; Cejr, 1947; Cantino, 1948, 1949; Emerson, Cantino, 1948; Poitras, 1955; Nagai, Kobayashi, 1959; Дудка, 1963; Emerson, 1964). Перед погружением плодов в водоем их протирают ватой, смоченной в эфире, чтобы снять восковой налет, затрудняющий развитие грибов. Плоды извлекают из водоема через 2—4 недели. За это время на поверхности приманок образуются пустулы грибов из рода *Blastocladia*, а также представителей некоторых других систематических групп, например пор. *Leptomitales*. Приманки, извлеченные из водоема, помещают в сосуды с водой и доставляют для последующей обработки в лабораторию.

Для обнаружения представителей трех других родов сапрофитных грибов сем. *Blastocladiaceae* — *Blastocladiopsis*, *Blastocladia* и *Allomyces*, обитающих преимущественно в грунтах и илах, а также в воде различных водоемов, отбирают пробы воды из исследуемого водоема и в них в лаборатории помещают различные приманки. Наиболее подходящими приманками для выявления этих грибов являются прокипяченные семена конопли, листья кукурузы и различных диких злаков, реже мертвые насекомые и такой необычный субстрат, как змеиная кожа (Emerson, 1941, 1958, 1964; Couch, Whiffen, 1942; Willoughby, 1959b; Sparrow, 1960, и др.), причем виды рода *Allomyces* предпочитают развиваться на семенах конопли, а *Blastocladia* — на листьях злаков.

Виды сем. *Catenariaceae* весьма разнообразны по образу жизни: среди них известны облигатные сапрофиты (*Catenomyces* sp.), облигатные паразиты (*Catenaria allomycis*) и факультативные паразиты — *Catenaria anguillulae*, развивающаяся как сапрофит на растительных остатках и как паразит на водных беспозвоночных, в основном на нематодах. Сапрофитные виды катенариевых грибов выявляют методом приманок, для этого используют прокипяченные листья кукурузы и других злаков, мертвых насекомых и др. (Karling, 1934; Couch, 1945a; Sparrow, 1960); факультативных паразитов также обнаруживают с помощью этих приманок, а кроме того, проводят сбор водных беспозвоночных — возможных хозяев этих грибов.

Получение чистых культур. Обработка собранных таким образом представителей пор. *Blastocladales* проводится общепринятыми для сапрофитных фикомицетов способами. Приманки, извлеченные из водоема или пробы воды, отмывают от ила и детрита

в сильной струе проточной воды и затем под микроскопом пинцетом отделяют из пустулы часть гриба с зооспорангиями, наименее загрязненную бактериями. Зооспорангии переносят в чашку Петри со стерильной водой, под микроскопом капиллярной пипеткой собирают выходящие из них зооспоры и помещают их в чашку со свежей стерильной водой. Зооспоры промывают в нескольких сменах стерильной воды, чтобы по возможности удалить бактерий, а затем пипеткой переносят в чашки с питательной средой (Emerson, Cantino, 1948).

Для изучения морфологии и жизненного цикла бластокладидальных грибов вполне пригодны так называемые грубые культуры — выращивание грибов на плодах, погруженных в сосуды со стерильной дистиллированной или со стерильной прудовой водой, при 8—15° (Kanouse, 1927a; Lloyd, 1938; Cantino, 1948). Иногда в качестве приманок для таких грубых культур используют стерильные кусочки помидоров и зерна пшеницы (Emerson, Cantino, 1948).

Для исследований по цитологии, физиологии и генетике видов из пор. *Blastocladales*, которые после открытия у *Allomyces javanicus* анизогамного полового процесса и чередования изоморфных поколений (Книер, 1929, 1930) являются признанными объектами при изучении ряда генетических проблем, необходимо получение их чистых культур на искусственных питательных, желателно синтетических, средах.

Культивирование. Представители этого порядка по сравнению с водными грибами из некоторых других систематических групп довольно легко выделяются и культивируются, в первую очередь на различных средах неопределенного химического состава.

П и т а т е л ь н ы е с р е д ы. Грибы-сапрофиты из сем. *Blastocladiaceae* культивируют на широком наборе таких сред, в том числе на агаризованных средах с кукурузной мукой и со сливовым отваром, а также просто на сливовом отваре (Emerson, Cantino, 1948), на среде, в состав которой входят пептон — 1.25 г, дрожжевой экстракт — 1.25 г, глюкоза — 3.0 г (с агаром — 20.0 г или без него) на 1 л дистиллированной воды (Cantino, 1951; 1956; Cantino, Hyatt, 1953; Cantino et al., 1957; Horenstein, Cantino, 1961). Иногда к жидкому варианту этой среды добавляют 0.9 мл 0.04%-го водного раствора бромкрезола пурпурового (Brown, Cantino, 1955; Horenstein, Cantino, 1961), а иногда буфер из лимонной кислоты — $3.2 \cdot 10^{-3}$ М и Na_2HPO_4 — $7.2 \cdot 10^{-3}$ М (Horenstein, Cantino, 1964), из 2-амино-2(оксиметил)-1,3-пропандиола — 0.6 г (Griffin, 1965) или из бикарбоната Na $8.5 \cdot 10^{-3}$ М (Lovett, Cantino, 1960; Domnas, 1968; Cantino, 1969). Выращивают культуры грибов из сем. *Blastocladiaceae* на этой же среде (0.3% глюкозы + 0.125% пептона + 0.125% дрожжевого экстракта) в присутствии набора солей $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 и $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Gleason, Unestam, 1968a). Из сред неопределенного химического состава для культивирования грибов сем. *Blastocladiaceae* исполь-

зуют также 0,5%-е глюкозный и триптонный бульоны с бромкрезолом пурпуровым (Crasemann, 1957), различные варианты глюкозо-дрожжевой среды с минеральными солями (Emerson, Cantino, 1948; Cantino, 1949; Emerson, 1958) и пептоно-глюкозную среду (Griffin, 1965). Бластокладиевые грибы хорошо растут на всех вышеуказанных средах, однако наиболее благоприятные условия для их роста и развития обеспечивает жидкая или агаризованная крахмало-дрожжевая среда YpSs (стр. 15). На этой среде выделяют и культивируют виды родов *Allomyces*, *Blastocladiella*, *Blastocladiella* из сем. *Blastocladiaceae* (Emerson, 1941, 1958, 1964; Barner, Cantino, 1952; Machlis, 1953a; Machlis, Ossia, 1953a, 1953b; Ingraham, Emerson, 1954; Emerson, Wilson, 1954; Machlis, Crasemann, 1956; Foley, 1958; Willoughby, 1959b; Skucas, 1967, 1968) и другие, а также *Catenaria anguillulae* из сем. *Catenariaceae* (Ichida, Fuller, 1968; Nolan, 1970b). Ранее *C. anguillulae* культивировали на среде неопределенного состава с экстрактом печени и на среде с мясным экстрактом (0,03%) и агаром (1,5%) (Couch, 1945a).

Для изучения метаболизма грибов из пор. *Blastocladiales*, как уже отмечалось, желательнее культивировать эти грибы на синтетических средах. Еще в 1943 г. один из видов рода *Allomyces* был получен в чистой культуре на среде, состоящей из глюкозы (0,5%), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,025%), KH_2PO_4 (0,05%), глутаминовой кислоты (0,3%) и тиамин (10—25 мкг/л) (Quantz, 1943). В настоящее время для культивирования грибов из сем. *Blastocladiaceae* разработано несколько основных синтетических сред, данные о которых сведены в табл. 2 (см. Приложение). Некоторые из приведенных сред являются стандартными для выращивания видов определенного рода грибов. Так, среда Мехлиса используется для культивирования видов рода *Allomyces* (Machlis, 1953a, 1953b, 1957; Machlis, Ossia, 1953a, 1953b; Machlis, Crasemann, 1956; Foley, 1958; Nolan, 1959), а среда Барнера и Кантино — для культивирования видов родов *Allomyces* и *Blastocladiella* (Barner, Cantino, 1952; Griffin, 1965).

Синтетические среды для представителей сем. *Catenariaceae* не были разработаны. Лишь недавно *Catenaria anguillulae* была выращена на среде определенного химического состава, которая представляет собой модификацию среды Мехлиса (Nolan, 1970a, 1970b).

При приготовлении среды Мехлиса вначале автоклавируют в течение 15 мин. при 1,5 атм. по отдельности глюкозу, растворы солей Са и Mg, остальную часть среды, а перед употреблением их смешивают.

Условия культивирования грибов из пор. *Blastocladiales* различны в зависимости от отношения исследуемых видов к факторам окружающей среды, от задач исследования и т. д. На твердых средах, в частности на YpSs, грибы выращивают в чашках Петри и пробирках при 21—25° в течение 7 дней (Yaw, Cutter, 1951; Machlis, 1953a, 1953b; Machlis, Ossia, 1953a, 1953b; Foley, 1958;

Skucas, 1967, 1968; Ichida, Fuller, 1968). Культивирование производится как на свету, так и в темноте. На жидких средах, в частности на среде Мехлиса, бластокладиевые грибы культивируют на горизонтальных качалках (120 об./мин.) при 20—25° в специальных колбах (125 мл) с крышками; в каждой колбе содержится 50 мл среды (Machlis, 1953a, 1953b; Machlis, Ossia, 1953a, 1953b; Nolan, 1969, 1970a, 1970b). Реже выращивают грибы на жидких средах в обычных условиях (Cantino, 1949; Crasemann, 1957).

Грибы пор. *Monoblepharidales* (рис. 7)

Виды грибов из этого порядка — типичные облигатные сапрофиты, развивающиеся на погруженных в пресные водоемы субстратах, в основном растительного происхождения: на покрытых корой ветках ясеня, дуба, березы, вяза, ольхи, каштана, тополя, ивы, ели, сосны и некоторых других пород (виды рода *Monoblepharis*, реже *Gonapodya*), на различных плодах, в особенности на яблоках и шиповнике, а также помидорах (виды рода *Gonapodya*), на других растительных остатках — хвоинках и шишках, лишайниках и шляпочных грибах и т. д. (Sparrow, 1933, 1960; Perrott, 1955, 1960a; Johns, 1959). Иногда моноблефаридальные грибы обнаруживают на погруженных в воду трупах насекомых.

Сбор. Для выявления представителей пор. *Monoblepharidales* в исследуемом водоеме помимо непосредственного сбора погруженных в воду вышеперечисленных субстратов широко применяются приманки, в качестве которых используются плоды и ветви (Sparrow, 1933, 1960; Johns, 1959; Perrott, 1960a).

Особенностью, характерной для грибов из рода *Monoblepharis*, является их приуроченность к водоемам относительно спокойным, имеющим приток свежей воды и лишенным большого количества продуктов разложения органических веществ (Sparrow, 1933, 1960; Perrott, 1955, 1960a). Такие водоемы и являются местом сбора моноблефаридовых грибов.

Приманки извлекают из водоема через 2—3 недели, переносят в лабораторию, где после обычной обработки под струей воды помещают в сосуды со стерильной дистиллированной водой или со смесью стерильной прудовой и дистиллированной воды (1 : 1) и содержат при 3—8°. При таком содержании рост гриба на приманках поддерживается длительное время, что обеспечивает материал для исследований.

Получение чистых культур. Для получения чистых культур острой препаровальной иглой отделяют несколько спорангиев от таллома гриба на приманке, промывают их в десяти сменах стерильной дистиллированной воды, а затем помещают в чашки Петри или на предметные стекла с водой, при выходе зооспор собирают их капиллярной пипеткой и высевают в чашку Петри с агаризованной средой или в колбы с жидкой средой. Иногда на среду высевают целый спорангий. Ограничение распространения бактериаль-

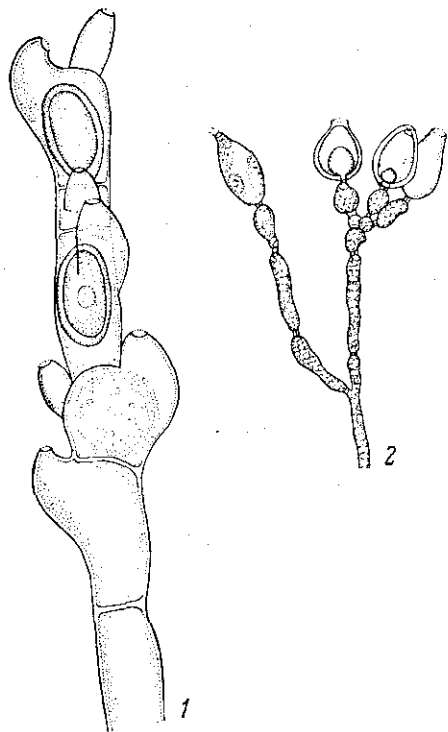


Рис. 7. Грибы пор. *Monoblepharidales*.
1 — *Monoblepharis insignis*, гифа, несущая антеридии и оогонии с зооспорами; 2 — *Gonapodya polymorpha*, пролиферация спорангиев.

ного загрязнения на поверхности агаризованных сред проводится с помощью колец Ван Тигема по Реперу (Raper, 1937), в центре которых помещают несколько капель стерильной воды с зооспорами или спорангием. Гифы гриба, которые выходят за пределы кольца и лишены бактериального загрязнения, используют для дальнейших пересевов с целью получения чистой культуры (Perrott, 1958).

В настоящее время разработан более усовершенствованный метод получения чистых культур моноблефаридовых грибов (род *Monoblepharis*) на среде с 1% триптона. На агаризованной (1% агара) триптонной среде получают рост гриба без

бактериального загрязнения в результате использования колец Ван Тигема. На жидкой питательной среде, куда переносят блок агара с мицелием, развиваются в течение 4—5 дней спорангии гриба. Через ватную пробку в колбу вводят иглу шприца, набирают несколько миллилитров культуральной жидкости с многочисленными зооспорами и пересевают их в чашки Петри на агаризованную триптонную среду (Perrott, 1958).

Культивирование. Выделение и культивирование грибов пор. *Monoblepharidales* производится на средах полусинтетических и средах неопределенного химического состава, причем агаризованные среды обеспечивают в основном вегетативный рост гриба, а жидкие — образование спорангиев и в особых случаях органов полового размножения.

Питательные среды. Представителей пор. *Monoblepharidales* выделяют в чистую культуру на среде с сахарозой (15.0 г), пептоном (5.0 г) и минеральными солями: NaNO_3 — 2.0, KCl — 0.5, K_2HPO_4 — 0.5, MgSO_4 — 0.5 и $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ — 0.01 г. Эту среду готовят с агаром (20.0 г) или без него на смеси дистиллированной воды (0.5 л) с отфильтрованной прудовой водой (0.5 л) (Perrott, 1955). На агаризованной среде гриб дает только вегетативный рост; на жидкой — образует спорангии. Спорангии пересевают в колбу, наполненную стерильной смесью прудовой

и дистиллированной воды (1 : 1), в которую помещают простерилизованный в 95° спирте помидор с проколотой в нескольких местах кожицей. На этой среде приблизительно через 4 недели развивается чистая культура гриба, образующего половые органы (Perrott, 1955).

Также возможно культивирование моноблефаридальных грибов на агаре с кукурузной мукой (Emerson, 1958) и на более сложной среде неопределенного химического состава с глюкозой (0.5%), триптоном (0.5%), минеральными солями ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.04, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0.037, KCl — 0.093, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.005 г) и микроэлементами, а также с 0.66 М фосфатным буфером на 1 л воды (Unestam, 1966; Gleason, Unestam, 1968a). Синтетические среды для выращивания представителей пор. *Monoblepharidales* не разработаны.

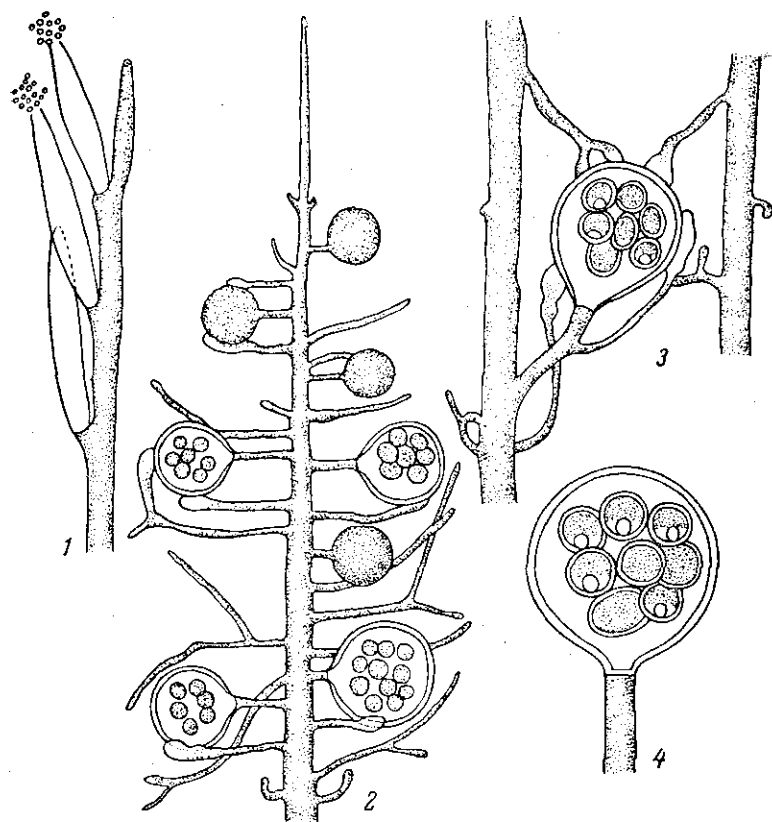
В большинстве случаев посевы моноблефаридальных грибов на твердых и на жидких средах инкубируют в стационарных условиях при 15—20° (Perrott, 1955, 1958), хотя иногда на жидких средах их выращивают на качалке (Gleason, Unestam, 1968a).

Грибы пор. *Saprolegniales* (рис. 8)

Все сапрофитные представители этого порядка — из сем. *Saprolegniaceae*. В естественных условиях в пресных водоемах сапролегниевые грибы обычно развиваются как сапрофиты на самых разнообразных субстратах растительного и животного происхождения, погруженных в воду (Coker, 1923; Johnson, 1956; Cejr, 1959; Scott, 1961; Seymour, 1970). Иногда наблюдается переход этих грибов от сапрофитизма к факультативному паразитизму на рыбах и икре (Tiffney, Wolf, 1937; Tiffney, 1939a, 1939b; Willoughby, 1968a, 1970).

Сбор. С учетом субстратов, на которых сапролегниевые грибы встречаются в водоемах, составлен набор приманок, используемых для обнаружения грибов этой группы. В отличие от других водных фикомицетов (кроме представителей пор. *Chytridiales*) для выявления сапролегниевых грибов в исследуемых водоемах используются не только приманки растительного происхождения, такие как семена конопли, семена и проростки льна, гороха, бобов, различные плоды, веточки древесных растений и т. п., но также разнообразные приманки животного происхождения, в том числе мертвые личинки и взрослые особи различных насекомых (особенно для этой цели хороши комнатные мухи, личинки мушек из плодовых тел шляпочных грибов, «мучные черви», муравьиные «яйца», майские жуки и их личинки), кусочки мяса, белок вареного яйца и др. (Cejr, 1959). Применяется два способа использования приманок для выявления сапролегниевых грибов в водоеме.

Первый способ — непосредственное погружение приманок в исследуемый водоем в контейнере одной из описанных

Рис. 8. Грибы пор. *Saprolegniales*.

А — *Achlya debaryana*: 1 — спорангии удлиненные и кельевидные с зооспорами; 2 — незрелые оогонии и антеридии; 3 — зрелый оогоний с ооспорами и антеридии; 4 — оогоний со зрелыми ооспорами.

выше конструкций (Cooke, Bartsch, 1959, 1960; Cejp, 1959; Willoughby, 1962a, 1962b). Однако в последнее время наиболее широко применяемый способ — это погружение в водоем так называемых алюминиевых шариков (Cooke, Bartsch, 1959, 1960; Seymour, 1970). Три-четыре половинки простерилизованных кипячением семян конопли заворачивают в алюминиевую фольгу, образовавшиеся шарики прикрепляют к нейлоновой нити и погружают в водоем. Минимальный срок погружения приманок 2—3 дня в летнее время и 10 дней в зимнее. После извлечения их из водоема половинки семян конопли промокают стерильной фильтровальной бумагой, заворачивают в новую стерильную фольгу и без воды доставляют в лабораторию. Такие завернутые в фольгу шарики

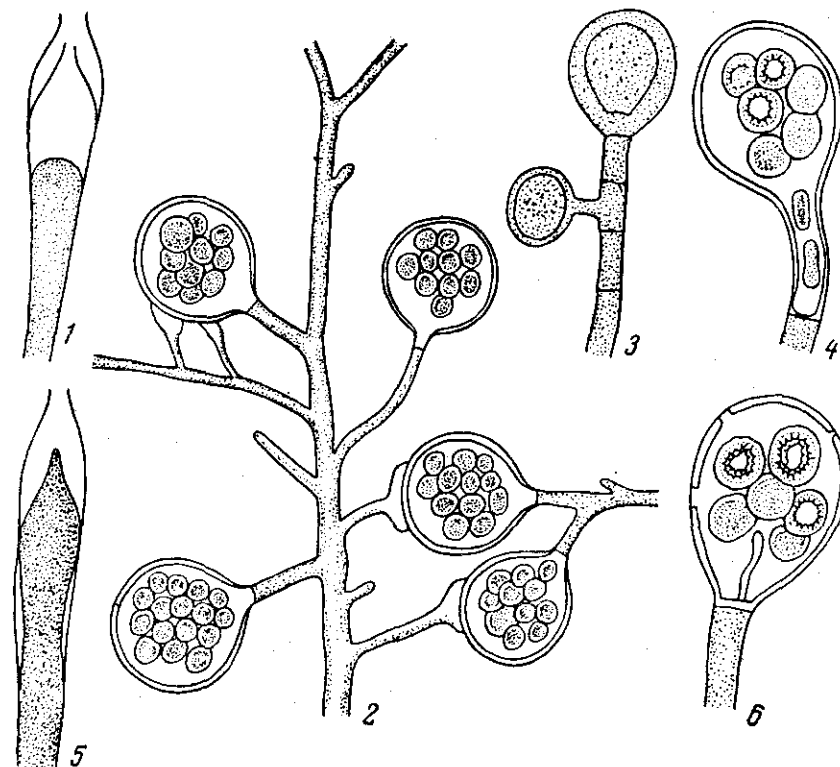


Рис. 8 (продолжение).

Б — *Saprolegnia ferax*: 1, 5 — пролиферация спорангиев; 2 — веточки с оогониями и антеридиями; 3 — развивающийся оогоний; 4 — оогоний с удлиненной шейкой; 6 — оогоний и антеридий.

можно даже пересылать по почте (Cooke, Bartsch, 1959, 1960). Извлеченные из водоема приманки в сосудах с водой доставляются в лабораторию, где подвергаются дальнейшей обработке.

Второй способ — отбор проб воды с последующим погружением приманок в сосуды с этими пробами. Стандартной приманкой в данном случае являются семена конопли, простерилизованные кипячением в течение 10—30 мин. (Harvey 1925; Whiffen, 1945; Bhargava, 1946; Newby, 1948a, 1948b; Goldie-Smith, 1950, 1956; Ziegler, 1953; Poitras, 1955; Johnson, 1956; Cejp, 1959; Cooke, Bartsch, 1959, 1960; Barksdale, 1960, 1970; Dick, 1960; Perrott, 1960a; Dayal, 1961; Dick, Newby, 1961; Scott, 1961; Dayal, Tandon, 1962, 1963; Hughes, 1962; Roberts, 1963; Emerson, 1964; Dayal, Thakur, 1966, 1969; Slifkin, 1967; Srivastava, 1967; Miller, Ristanovic, 1969; Sherwood, 1969; Seymour, 1970;

Томы, 1970, и мн. др.). Реже для погружения в пробу воды используют другие приманки — проростки льна, муравьиные «яйца», муравьев, «мучных червей», мух (Cejr, 1931, 1932a, 1934; Ward, 1939a; Newby, 1948a, 1948b; Emerson, 1964; Dayal, Thakur, 1969).

Для обнаружения сапролегниевых грибов кроме метода приманок в двух его вариантах применяют также непосредственный сбор и последующую микроскопию различных субстратов, погруженных в водоем (Cejr, 1931). В настоящее время этот метод сбора чаще применяется для выявления сапролегниевых грибов, развивающихся как факультативные паразиты на рыбах, раках, икре.

В лаборатории приманки, извлеченные из водоема, отмывают под сильной струей воды и помещают в чашки Петри или кристаллизаторы, наполненные стерильной дистиллированной или прудовой водой. В эти же сосуды добавляют половинки стерильных семян конопли. Пробу воды из исследуемого водоема разливают в стерильные чашки Петри или кристаллизаторы и вносят в них стерильные семена конопли. В тех случаях, когда пробы воды содержат большое количество органических веществ в виде растительных и животных остатков, их разбавляют, добавляя к 35 мл пробы по 10—15 мл дистиллированной воды. Разведение производится до того, как в пробу помещают приманку (Seymour, 1970). Иногда исследование проб воды из исследуемого водоема проводится несколько иначе. В широкогорлые сосуды (250 мл), куда отбираются пробы воды, не позже чем через 6 час. после отбора пробы, на стерильных стеклянных крючках вводят под поверхность воды десять стерильных половинок семян конопли. Пробу воды с семенами конопли выдерживают в течение 24 час. в темноте при комнатной температуре. После этого семена конопли переносят в два кристаллизатора, содержащие стерильную дистиллированную воду с кристаллическим пенициллином (2000 ед./л). В каждый кристаллизатор помещают по 5 половинок семян, один кристаллизатор оставляют при комнатной температуре, другой помещают в холодильник при 5° (Roberts, 1963).

Получение чистых культур. Выделение чистой культуры сапролегниевых грибов на питательные среды производится обычными способами. Наиболее распространенные из них следующие: 1) многократные пересевы одной гифы гриба, повторяющиеся до тех пор, пока не будет получена чистая культура; 2) посев собранных в микропинетку зооспор гриба. Последний способ обычно сочетается с применением колец Ван Тигема (Raper, 1937). Вероятность получения чистых культур сапролегниевых грибов с помощью этого способа значительно выше. Вообще же получение чистых культур сапролегниевых грибов сопряжено с известными трудностями, которые объясняются тем, что в природе эти водные грибы чаще, чем другие фикомицеты, встречаются в водоемах на животных субстратах, где количество бактерий особенно велико. При посеве на питательные среды при одинаковой температуре инкубации грибы растут медленнее, чем бактерии.

Метод многократных пересевов гифы на свежую среду не всегда позволяет освободить культуру гриба от сопутствующей бактериальной флоры. Принимая это во внимание, были разработаны способы угнетения и подавления роста бактерий для получения чистых культур сапролегниевых грибов. Один из них заключается в обработке питательной среды ультрафиолетовым облучением (Blank, Tiffney, 1936). Среду, в состав которой входят пептон, леулеза и агар, автоклавируют, разливают в чашки Петри, а затем эти чашки со средой облучают ртутно-кварцевой лампой (общая интенсивность радиации 6.27 эрг/мм² в сек.) на протяжении 3 час. Обработанная таким образом среда задерживает рост бактерий и создает условия для получения чистых культур сапролегниевых грибов. Другой способ, более распространенный, заключается в том, что в питательную среду вводят антибиотики или другие бактериостатические агенты (Seymour, 1970).

Культивирование. Хороший рост чистых культур сапролегниевых грибов наблюдается на разнообразных питательных средах неопределенного химического состава.

Питательные среды. Сапролегниевые грибы являются одной из первых групп водных фикомицетов, полученных в чистой культуре на питательных средах, таких как «гороховая» вода, слабый мясной экстракт (1—2%), желатина с пептоном, смесь воды и белка, воды и казеина, 0.1%-й раствор лейцина с фосфатом Са (0.1%), желатина с мясным экстрактом, среды с пептоном в различных концентрациях (0.05—0.1%) и т. д. (Obel, 1910; Pieters, 1915; Sparrow, 1960).

Для выделения чистых культур сапролегниевых грибов используют агаризованные среды, приготовленные с ржаной, пшеничной или кукурузной мукой (Cejr, 1931, 1932a; Ward, 1939a; Salvin, 1942; Harvey, 1952; Emerson, 1958, 1964; Willoughby, 1962b; Sherwood, 1969). Особенно часто применяется для выделения и культивирования сапролегниевых грибов агар с кукурузной мукой, реже — отвар из гороховой муки (Greenwood, 1955) и агар с гороховым отваром (Міловцова, 1936). Сапролегниевые грибы выделяют и культивируют также и на средах более определенного состава, в том числе на некоторых универсальных средах, таких как картофельно-декстрозный агар, агар Сабура (Harvey, 1952; Тома, 1970), а также на среде с мальтозой (5%) и пептоном (0.1%) с агаром или без него (Ward, 1939a; Newby, 1948a), на среде с мальц-экстрактом (0.5%) и пептоном (0.1%) (Whiffen, 1945; Poitras, 1955) на глюкозо-дрожжевой среде по Эмерсону (Emerson, 1958; Bakerspiegel, 1960), на среде, в состав которой входят глюкоза (0.5%), дрожжевой экстракт (0.1%) и растворимый крахмал (0.5%) (Reischer, 1951a; Willoughby, 1962b; Thakur, Dayal, 1966) и др. Еще более сложный по составу вариант среды для культивирования сапролегниевых грибов предлагает Дик (Dick, 1965). Кроме глюкозы (10.0 г), дрожжевого экстракта (2.0 г) и растворимого крахмала (5.0 г) в ее состав входят Na_2HPO_4 — 0.597,

KH_2PO_4 — 2.043, K_2TeO_3 — 0.1 г и агар — 12.0 г на 1 л дважды дистиллированной воды. Культивируют сапролегниевые грибы и на крахмало-пептонной среде, содержащей растворимый крахмал — 0.2%, пептон — 0.1%, соли KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и CaCl_2 по 0.0005 М и 2% агара (Barksdale, 1960, 1962a); на среде с глюкозой — 0.5 г, лимонной кислотой — 0.5 г и агаром — 7.5 г на 1 л воды, к которым добавляют 20 мл раствора, состоящего из KH_2PO_4 — 2.0 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0.1 г и MgSO_4 — 0.1 г в 400 мл воды (Cejr, 1959). Иногда используют комбинации таких компонентов, как кукурузная мука — 17 г, пептон — 1.0 г, дрожжевой экстракт — 1.0 г, глюкоза — 5.0 г и растворимый крахмал — 5.0 г, дистиллированная вода — 1 л (Miller, Ristanovic, 1969).

Все эти среды неопределенного химического состава пригодны для выделения сапролегниевых грибов, как сапрофитов, так и факультативных паразитов. Однако для культивирования последних предлагаются также и несколько более специализированные среды.

Постепенное усложнение состава питательных сред, на которых выделяют и культивируют сапролегниевые грибы, привело к тому, что еще в 1932 г. была разработана синтетическая среда для получения чистых культур этих грибов (Volkonsky, 1933). В дальнейшем был предложен целый ряд сред определенного химического состава. Основные синтетические среды для сапрофитных представителей пор. *Saprolegniales* приведены в табл. 3 (см. Приложение). Из приведенных в таблице сред в настоящее время широко применяется среда Скотта, Пауелла и Сеймура, известная как глюкозо-глутаматная среда, используемая для выделения и культивирования видов рода *Saprolegnia* (Seymour, 1970). Для выращивания сапролегниевых грибов из разных родов (*Achlya*, *Isoachlya*, *Saprolegnia*) применяют среду Бхаргавы (Dayal, 1961), а для культивирования грибов из родов *Saprolegnia*, *Achlya*, *Thraustotheca* и *Aphanomyces* — среду Унестам (Unestam, Gleason, 1968). Кроме приведенных в таблице известно еще несколько синтетических сред, пригодных для сапролегниевых грибов. Так, Барксейл (Barksdale, 1960b, 1962b) культивирует виды рода *Achlya* на питательной среде определенного химического состава, которая представляет собой незначительно измененную среду Мехлиса (Machlis, 1953a, 1953b) для выращивания видов рода *Allomyces* из пор. *Blastocladales* (см. Приложение, табл. 2). В процессе культивирования видов рода *Achlya* среда Мехлиса претерпевает более существенные изменения: ряд компонентов добавляется [трис (оксиметил)аминометан, * натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА)], ряд исключается, в частности из солей, входящих в состав смеси Мехлиса, но Барксейл остаются только

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Barksdale, 1960, 1963a, 1963b, 1965, 1966, 1970). Некоторые синтетические среды для сапролегниевых грибов являются комбинациями уже известных сред Уиффен, Райшер, Барксейл и др. (Elliott, 1967; Sherwood, 1969).

Условия культивирования сапролегниевых грибов весьма разнообразны. Оптимальные температуры для выделения чистых культур грибов 18—20° (Seymour, 1970). Однако культивирование обычно проводится при более высокой температуре — 25° (Dayal, 1961; Barksdale, 1962a, 1962b, 1963a, 1963b, 1966; Elliott, 1967; Sherwood, 1969). При более низких температурах культивирования наблюдаются и рост и образование органов размножения, при более высоких — только рост. Культуры на твердых и жидких средах чаще выращивают в стационарных условиях, но в ряде случаев лучший рост сапролегниевых грибов происходит на качалках (100 об./мин.) (Unestam, 1965).

Грибы пор. *Leptomitales* (рис. 9)

Представители двух семейств (*Leptomitaceae* и *Rhipidiaceae*) этого порядка являются сапрофитами, которые развиваются в пресных водоемах на различных растительных остатках, в особенности на погруженных в воду ветвях деревьев и различных плодах (шиповник, яблоки, груши), в виде хлопьеобразных скоплений гиф или в виде небольших серовато-белых пустул на поверхности субстрата (Kanouse, 1927b; Cejr, 1959; Sparrow, 1960; Emerson, Weston, 1967). Этим и определяются методы сбора фикомицетов из пор. *Leptomitales*.

Сбор. В основном для сбора лептомитальных грибов применяют погружение в исследуемый водоем различных приманок: ветвей дуба, сливы, березы, ольхи, ясени, ивы и, что особенно интересно, различных хвойных пород — ели, сосны, а также плодов — яблок, груш, глода, шиповника, мушмулы, сливы, черешни, винограда, черники, помидор, а также клубней картофеля (Cejr, 1932b, 1959; Sparrow, 1960; Emerson, Weston, 1967). Для обнаружения лептомитальных грибов в исследуемом водоеме собирают различные растительные остатки, погруженные в воду, и микроскопируют их в лаборатории. На приманках и растительных остатках, извлеченных из водоема, лептомитальные грибы обычно развиваются вместе с представителями пор. *Blastocladales*. Виды пор. *Leptomitales* выявляют также путем отбора проб воды из исследуемого водоема, в которые в лаборатории помещают приманки, главным образом варенные семена конопли и зерна пшеницы, мертвых мух и термитов, змеиную кожу и др. (Cejr, 1932b, 1959; Coker, Leitner, 1938; Johnson, 1955; Sparrow, 1957, 1960; Dick, 1964; Emerson, Weston, 1967). Для некоторых представителей порядка, в частности для гриба *Leptomitus lacteus*, характерно образование

* 2-амино-2(оксиметил)-1,3-пропандиол = трис(оксиметил)аминометан (ТНАМ).

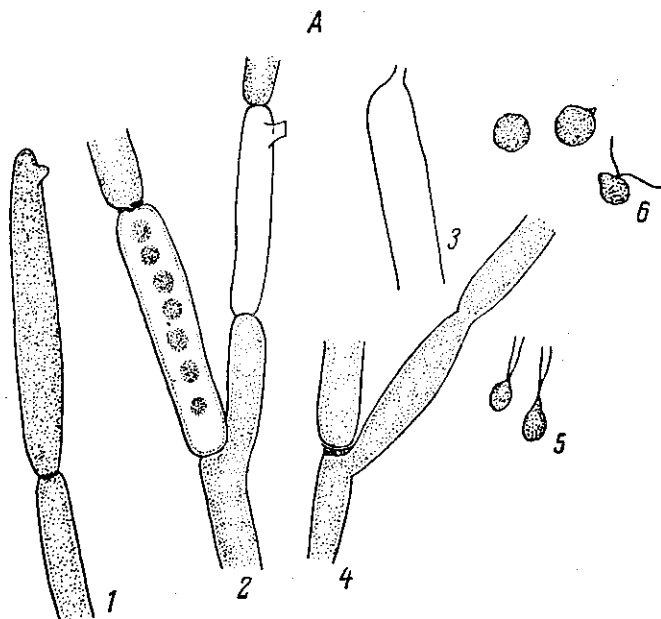


Рис. 9. Грибы пор. *Leptomitales*.

А — *Leptomitales lacteus*: 1 — терминальный спорангий в начальной стадии развития; 2 — интеркалярные развивающийся спорангий и опустошенный спорангий с коротким выводным каналцем; 3 — опустошенный спорангий с отверстием; 4 — распадающаяся веточка; 5, 6 — первичные зооспоры, цисты и вторичные зооспоры.

в водоемах с высокой концентрацией органических веществ больших (до нескольких десятков сантиметров в длину) слизистых хлопьевидных скоплений мицелия непосредственно в воде, а также в виде обрастаний, прикрепленных к различным подводным предметам (сваи, набережные, пристани и т. д.). Скопления гриба *L. lacteus* из воды улавливают с помощью подвесных рамок (величина ячеек сетки 2 см²), которые опускают на глубину 4 м от поверхности воды на сутки. Обрастания *L. lacteus* соскабливают с подводных предметов с помощью пожей и скребков. Для обнаружения гиф этого гриба в грунте используют дночерпатели различной конструкции, в частности дночерпатель Петерсена (Павлинова, 1952; Коколия, 1967а, 1969).

Получение чистых культур. Доставленные в стерильной посуде в лабораторию грибы из пор. *Leptomitales*, как развившиеся на приманках, так и собранные на растительных остатках в воде или непосредственно из толщи воды, немедленно подвергаются соответствующей обработке перед выделением в чистую культуру. Их тщательно промывают в нескольких сменах стерильной дистиллированной воды, а затем общепринятыми методами (посев на среду зооспор, собранных капиллярной пастеровской пипеткой, реже

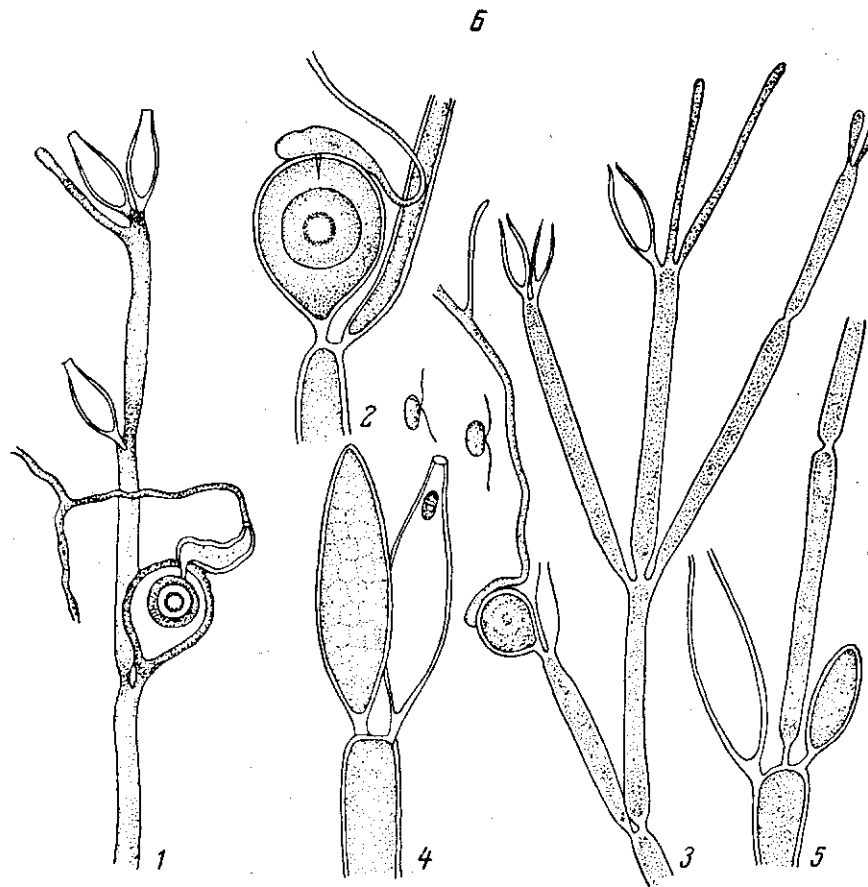


Рис. 9 (продолжение).

Б — *Sapromyces elongatus*: 1 — опустошенные спорангии и оогонии с антеридием; 2 — оогонии и антеридии; 3 — веточки со спорангиями; 4 — спорангии на различных стадиях развития зооспор; 5 — часть веточки со спорангиями.

посев на среду одной, по возможности лишенной бактериального загрязнения гифы или зооспорангия) получают чистые культуры на различных питательных средах. Лептомитовые (сем. *Leptomitaceae*) и рипидиевые (сем. *Rhipidiaceae*) грибы хорошо растут на различных питательных средах неопределенного химического состава.

Культивирование. Из лептомитовых грибов наиболее детально разработаны среды для выделения и культивирования *L. lacteus*, что объясняется важным практическим значением этого гриба — компонента биообрастаний и индикатора α -мезосапробной зоны в водоемах, загрязненных промышленными и бытовыми стоками.

Питательные среды. Гриб *L. lacteus* был выделен в чистую культуру на питательной среде неопределенного химического состава с высокомолекулярными веществами, содержащими органический азот, еще в 1903 г. (Kolkwitz, 1903). В дальнейшем среда, предложенная Кольквитцем, послужила основой для создания новых питательных сред для выращивания *L. lacteus*. Оптимальные условия для роста *L. lacteus* получает на среде Шейд, являющейся модификацией среды Кольквитца: 0.5% желатины, 0.001% бактопептона и 1% глюкозы на 0.5 л дистиллированной воды (Schade, 1940; Schade a. Thimann, 1940). Имеются данные о хорошем росте *L. lacteus* на агаризованных средах с мальц-экстрактом, отваром семян конопли, глюкозой и пептоном, а также на жидкой среде с глюкозой и пептоном и др. (Dick, 1964), на мясо-пептонном агаре (МПА), разведенном голодным агаром в соотношении 3 : 1, на 0.1%-х и 1%-х водных растворах пептона (Коколия, 1967а). *L. lacteus* успешно выделяют и культивируют также на средах определенного химического состава. Еще в 1940 г. гриб был выращен на среде, в состав которой входили неорганические соли (0.003 М KH_2PO_4 и 0.005 М MgSO_4), а в качестве источников азота одна из аминокислот: d- или l-аланин и l-лейцин, причем рост *L. lacteus* значительно стимулировало добавление к среде жирных кислот кроме муравьиной и пропионовой (Schade, 1940; Schade, Thimann, 1940). Хорошие результаты получают при культивировании *L. lacteus* на жидких средах следующего состава: MgSO_4 — 0.05 г, CuSO_4 — 0.05 г, K_2HPO_4 — 0.1 г, NaCl — 0.1 г, FeCl_3 — 0.001 г, пептон — 0.1%, глюкоза — 0.5% на 1 л дистиллированной воды (Коколия, 1968а, 1968б) и $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.12 г, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0.07 г, KH_2PO_4 — 1.36 г, Na_2HPO_4 — 0.71 г, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.0049 г, аминокислоты из гидролизата казеина — 2.8 г, глюкоза — 1.0 г, дрожжевой экстракт Difco — 0.7 г на 1 л дистиллированной воды (Gleason, 1968а; Gleason, Unestam, 1968b). Среду готовят, автоклавируя отдельно растворы солей и отдельно органических компонентов, а затем после охлаждения их сливают; pH среды 6.7.

Кроме *L. lacteus* хорошо поддаются выделению и культивированию на различных питательных средах, в основном неопределенного химического состава, виды родов *Apodachlya* и *Apodachlyella*. Виды рода *Apodachlya* выращивают на агаризованных средах с кукурузной мукой, мальц-экстрактом, отваром семян конопли, на глюкозо-пептонной и глюкозо-дрожжевой среде, на 5%-м триптонном бульоне, на глюкозо-пептонном бульоне и многих других неопределенных средах (Cejr, 1932b; Emerson, 1958; Dick, 1964), а также на некоторых полусинтетических и синтетических средах, в частности на среде, содержащей в качестве источников углерода глюкозу, лактозу, галактозу, мальтозу или рафинозу, а в качестве источников азота — аспарагин, глицин или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Gillpin, 1954). Некоторые из приведенных выше синтетических и полусинтетических сред для культивирования *L. lacteus* вполне при-

годны для выращивания видов рода *Apodachlya* (Schade, 1940; Schade, Thimann, 1940; Gleason, 1968а; Gleason, Unestam, 1968b). Среда Глеасона—Анестама для культивирования *Apodachlya* несколько изменена по сравнению с прописью этой среды для *L. lacteus*. В состав среды вводятся: глюкоза — 3.0 г, бактопептон — 1.25 г и дрожжевой экстракт — 1.25 г, а концентрация солей остается та же, что в среде для *L. lacteus*. Монотипный род *Apodachlyella* (*A. completa*) выделяют и культивируют на широком наборе сред неопределенного химического состава, в частности на среде YpSs с 0.01%-м теллуритом Na, а также на агаризованных средах с мальц-экстрактом и с отваром семян конопли, на твердой и жидкой глюкозо-пептонной среде (Dick, 1964).

Культивирование. Рипидиевые грибы сем. *Rhipidiaceae* были впервые выделены в чистую культуру в 1916 г. (von Minden, 1916) на желатине с отваром слив. В настоящее время эта среда, а также агар с кукурузной мукой и глюкозо-дрожжевая среда являются наиболее распространенными средами для выделения и культивирования представителей из родов *Araiospora*, *Mindeniella*, *Rhipidium*, *Sapromyces* (Bishop, 1940; Emerson, 1950, 1958; Golueke, 1957). Рипидиевые грибы этих родов выращивают также на средах более сложного химического состава, в частности на среде, разработанной Глеасоном и Анестамом для культивирования представителей пор. *Leptomitales* в модификации, приведенной для *Apodachlya* (Gleason, 1968а; Gleason, Unestam, 1968b; Gleason, Price, 1969). Кроме того, виды родов *Sapromyces* и *Mindeniella* культивируют на среде, в состав которой входят глюкоза — 3 г, аспарагин — 1.0 г, бромкрезол пурпуровый и неорганические соли (Gleason, 1968b).

Выделенный недавно из теплых непроточных водоемов гриб *Aqualinderella fermentans* (Emerson, Weston, 1967) привлек внимание исследователей необычной приспособленностью к существованию в атмосфере с высокой концентрацией CO_2 . Для выделения этого гриба сначала применяют простейший способ — получение культуры на погруженных в сосуд со стерильной водой плодах различных растений: яблок, помидоров, груш, шиповника, винограда и др., а также на клубнях картофеля. В качестве инокулюма в этот же сосуд вносят несколько тщательно отмытых в водопроводной воде талломов *Aqualinderella* с плода приманки.

Питательные среды. После получения чистой культуры гриба ее пересевают на различные питательные среды неопределенного химического состава, в том числе на некоторые стандартные среды, такие как агар с кукурузной мукой и глюкозо-дрожжевая среда (компоненты обеих сред входят в их состав в половинном количестве по сравнению с обычными их прописями), а также на ряд сред, специально приготовленных для *Aqualinderella*, в том числе на глюкозо-триптонную среду с лимонным соком (глюкоза — 5.0 г, триптон — 5.0 г, сок лимона —

4 мл на 1 л дистиллированной воды; pH 5.3), на желатино-пептонную среду (желатина — 5.0 г, пептон — 0.2 г на 1 л воды; pH 5.0), на среду с триптоном (5.0 г) и уксусной кислотой (0.15 мл) — pH 5.3; на среду с триптоном (5.0 г), лимонным соком (4 мл), бромкрезолом пурпуровым (5 мл/л 0.04%-го водного раствора) и неорганическими солями (KH_2PO_4 — 0.7 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 0.3 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1 г) — pH 5.8 и др. (Emerson, Held, 1969). Свежий лимонный сок стерилизуют холодной фильтрацией и добавляют асептически к среде. В настоящее время для культивирования *Aqualinderella* разработана более стандартизованная среда, в состав которой входят такие основные компоненты: глюкоза — 4.8 г, дрожжевой экстракт — 1.0 г, янтарная кислота — 0.6 г и NaOH, добавляемый к среде двумя порциями — 0.4 г перед автоклавированием и 0.52 г в процессе культивирования гриба для поддержания pH среды на уровне 6.1—6.3. Кроме того, обязательными компонентами этой среды являются $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0.15 г и масло из проростков пшеницы — 0.4 г (первый вариант). Готовят эту среду, растворяя перечисленные компоненты в 1 л дважды дистиллированной воды (Emerson, Held, 1969; Held, 1970; Held, Emerson, 1970). Второй вариант этой среды отличается тем, что среди компонентов отсутствует $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и, кроме того, среду готовят на смеси профильтрованной прудовой воды (1 часть) и дважды дистиллированной воды (2 части), к которой добавляют 0.1 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Held, 1970). Иногда в оба варианта среды входит также 5 мл/л 0.04%-го водного раствора бромкрезола пурпурового. Масло из проростков пшеницы добавляют к охлажденной после автоклавирования среде.

Замечания к культивированию пресноводных грибов-сапрофитов пор. *Leptomitales*. Условия культивирования представителей пор. *Leptomitales* различны в зависимости от требований гриба к условиям окружающей среды, от использования тех или иных сред, от задач исследования и т. д. На твердых питательных средах лептомитальные грибы культивируют в стационарных условиях, на жидких средах — иногда в стационарных (Коколия, 1967а, 1968а, 1968б; Gleason, Price, 1969), иногда на качалке (Gleason, 1968а; Gleason, Unestam, 1968b; Gleason, Price, 1969). Двухлитровые колбы Эрленмейера с 1 литром стерильной жидкой среды Глеасона — Алестамы в каждой, инокулированные *Leptomitus*, *Apodachlya*, *Sapromyces*, *Araiospora* или *Mindenella*, помещают на круговую качалку (120 об./мин.) и выращивают в течение 5—6 дней при 20°. Температура, при которой выращивают грибы из пор. *Leptomitales* в условиях искусственного культивирования, различна даже при выращивании их на средах более или менее одинакового состава. Так, на средах, содержащих пептон и желатину, *L. lacteus* культивировали при 20° (Schade, 1940; Schade, Thimann, 1940) и при 3—4° (Коколия, 1967а, 1968а, 1968б).

При культивировании рипидиевого гриба *Aqualinderella fermentans*, факультативного анаэроба, на большинстве искусственных питательных сред весьма часто необходимо создать анаэробные условия, особенно если в задачу исследований входит получение оогониев с ооспорами. Для этого инокулированные колбы помещают в специальные плотно закрываемые сосуды, из которых с помощью насоса отсасывают воздух, а затем наполняют соответствующей газовой смесью, содержащей CO_2 . Эти сосуды инкубируют при 23° и периодически их встряхивают (Held, 1970).

Для развития вегетативного мицелия гриба, который используется в качестве инокулюма, гриб *Aqualinderella fermentans* выращивают на питательных средах в атмосфере обычного воздуха, а затем переносят на свежую среду в атмосферу водорода с 5% CO_2 (Held, 1970).

Грибы пор. *Peronosporales* (рис. 10)

Все обитающие в воде представители этого порядка объединяются в сем. *Pythiaceae*. Род *Pythium* — главный род данного семейства. Он включает несколько десятков видов, которые приспособились к существованию в сильно увлажненной почве и в воде, где развиваются как сапрофиты на различных погруженных в воду остатках растительного и животного происхождения, а также как факультативные паразиты водорослей и беспозвоночных.

Сбор. Для обнаружения питневых грибов сем. *Pythiaceae* в водоемах собирают различные погруженные в воду субстраты, а также устанавливают специальные приманки — яблоки, груши, помидоры. Широко применяется также отбор проб воды с последующим погружением в них семян конопля, особенно для выделения грибов рода *Pythium* (Plaats-Niterink, 1968). Метод приманок позволяет обнаружить встречающиеся в пресных водоемах сапрофитные виды родов *Pythium*, *Phytophthora*, *Pythiogeton* (Sparrow, 1960; Plaats-Niterink, 1968).

Получение чистой культуры.* Обработка приманок, предшествующая выделению питневых грибов в культуру, проводится обычными способами, за исключением того, что наиболее загрязненные бактериями приманки обрабатывают пенициллином и стрептомицином (Plaats-Niterink, 1968). Выделение чистых культур грибов из сем. *Pythiaceae* на питательные среды производится

* Методы выделения и культивирования питневых грибов в целом разработаны достаточно полно, хотя при подборе питательных сред не всегда учитывается экологическое своеобразие различных видов грибов семейства, заключающееся в том, что один и тот же вид гриба может развиваться и в условиях увлажненной почвы и только в воде.

путем пересева верхушек наименее загрязненных бактериями гиф гриба.

Питательные среды. Наиболее благоприятной средой для выделения и культивирования питневых грибов является агар с кукурузной мукой (Sideris, 1931; Sparrow, 1931b; Emerson, 1958; Biesbrock, Hendrix, 1967; Al-Hassan, Fergus, 1968, 1969; Hendrix, 1968; Plaats-Niterink, 1968; Agnihotri, 1969; Hendrix, Campbell, 1969), а также агар с отваром семян конопли, который готовят следующим образом: 20–25 г семян кипятят 30 мин. в 0.5 л воды, затем фильтруют через вату; густой остаток после фильтрации смешивают с 0.5 л воды, кипятят 10 мин., фильтруют; после этого сливают оба фильтрата вместе и добавляют 2% агара (Sideris, 1931), или же 20 г семян конопли размалывают и смешивают с 40 мл воды; полученную суспензию автоклавируют и фильтруют; полученный экстракт переносят в 1 л воды, куда добавляют 20 г агара, после чего среду снова стерилизуют в автоклаве при 120° в течение 20 мин. (Biesbrock, Hendrix, 1967; Hendrix, 1968; Hendrix, Campbell, 1969). Вообще же питневые грибы культивируют на широком наборе сред неопределенного химического состава, в том числе на агаре с отваром зерен овса, с отваром из семян и мякоти арбуза, с отваром из семян дыни, на агаре с отваром моркови, на агаре с отваром картофеля (Sideris, 1931), на картофельно-декстрозном (Sparrow, 1931b) и на картофельно-морковном агарах (Plaats-Niterink, 1968), на агаре с отваром сои (Sideris, 1931) и с отваром бобов (Biesbrock, Hendrix, 1967), на агаре с 0.1% глюкозы (Agnihotri, 1969) и на так называемом питевом агаре, в состав которого входят сахароза и дрожжевой экстракт (Vaartaja, 1967). Существуют и более сложные по составу среды для культивирования представителей сем. *Pythiaceae* — среда Хендрикса с пептоном — 6.0 г, глицином — 1.9 г, KH_2PO_4 — 1.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5 г, тиамин — 2 мл (1000 ppm) и агаром 17.0 г на 1 л дистиллированной воды (первый вариант). Второй вариант этой среды имеет тот же состав, но к ней добавляют еще 20.0 г глюкозы (Hendrix, 1965).

Хороший рост, а также воспроизведение видов рода *Pythium* обеспечивает глюкозо-нитратная среда, в состав которой входят глюкоза — 5.4 г, NaNO_3 — 1.5 г, KH_2PO_4 — 1.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5 г, тиамин — 2 мл (1000 ppm), агар — 17 г на 1 л дистиллированной воды; pH среды 6.0 (Hendrix, 1965).

Успешно культивируют питневые грибы и на других средах. Например, на жидкой синтетической среде следующего состава: глюкоза — 10.0 г, NaNO_3 — 2.0 г, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 1.0 г, KCl — 0.5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5 г, 0.5%-е $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 0.4 мл на 1 л дистиллированной воды; pH среды 6.3 (Hine, 1960). Известна и модификация этой среды, где исключен KCl и $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ заменено $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1.0 мг, а также добавлены микроэлементы — $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; pH среды 8 (Hine, 1962).

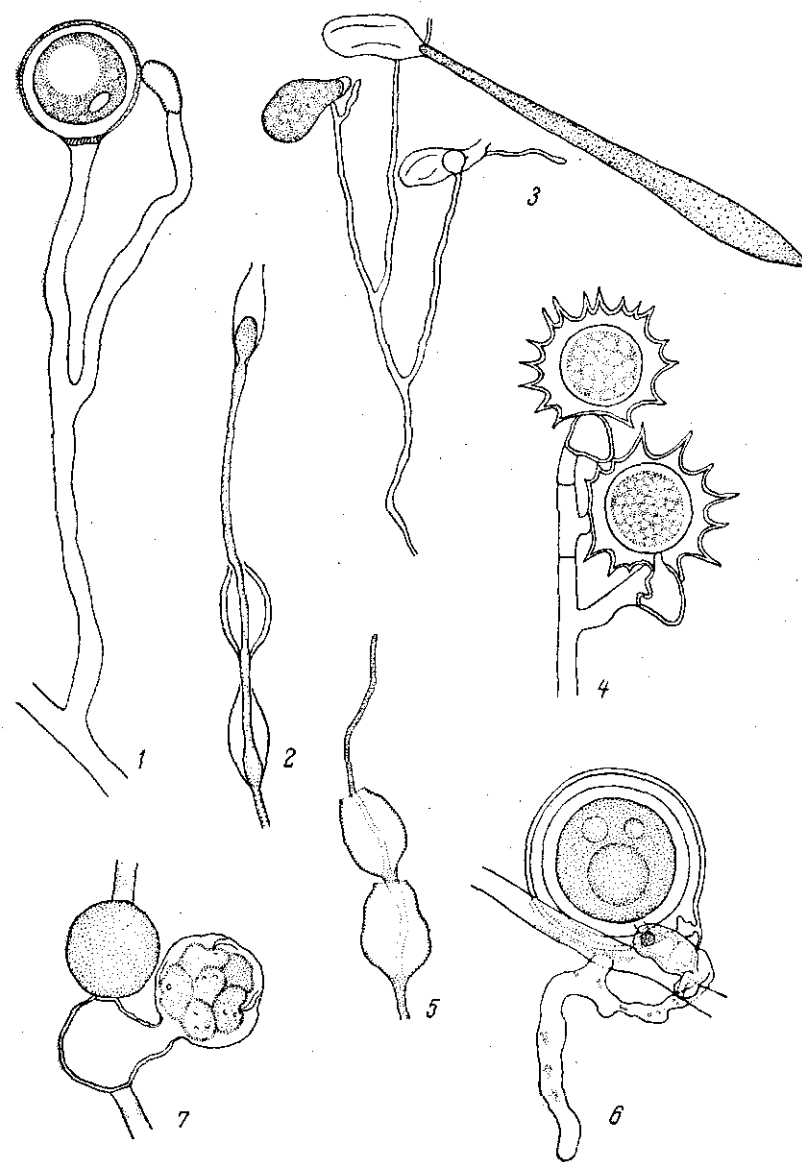


Рис. 10. Грибы пор. *Peronosporales*.

1 — *Pythium monospermum*, антеридий и ооспора с утолщенной оболочкой; 2 — *Pythium undulatum*, пролиферация спорангиев; 3 — *Pythiogeton transversum*, группа спорангиев (справа — опустошенные спорангии); 4, 7 — *Pythium echinulatum*: 4 — шиповидные ооспоры, 7 — интеркалярный спорангий, формирующий зооспоры в наружном, выходящем из спорангия пузыре; 5, 6, — *Phytophthora megasperma*: 5 — пролиферация спорангиев, 6 — оогоний, антеридий, ооспора.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕСНОВОДНЫХ
ГИФОМИЦЕТОВ ПОР. *HYPHOMYCETALES* ИЗ КЛАССА
DEUTEROMYCETES (FUNGI IMPERFECTI) (рис. 11, 12)

Методы исследования гифомицетов, обитающих в пресных водоемах характеризуются определенной спецификой. Эта специфика объясняется, с одной стороны, приуроченностью водных гифомицетов в основном к проточным хорошо аэрируемым незагрязненным водоемам и к погруженным в воду скелетонизированным листьям древесных пород в качестве субстрата, а с другой стороны, принадлежностью их к классу *Deuteromycetes*, представители которого резко отличаются от представителей класса *Phycomycetes* по морфологии, физиологии, циклу развития и другим признакам.

Сбор. Основным субстратом для водных гифомицетов служат погруженные в воду гниющие или уже скелетонизированные листья различных древесных пород — ольхи, граба, березы, дуба, липы, тополя, клена, ивы и др.; в отдельных случаях грибы из этой группы обнаруживаются на погруженных в воду ветках деревьев и кустарников, на стеблях трав, на хвощах, напоротниках, бумаге, древесине и других субстратах. Конидии водных гифомицетов в изобилии концентрируются в пене и пленке, которые часто образуются на поверхности воды в ручьях и небольших речках. Приуроченность водных гифомицетов к таким субстратам и биотопам определяет методы сбора грибов этой группы.

Для выявления водных гифомицетов в исследуемых водоемах собирают скелетонизированные и гниющие листья, а также другие субстраты, на которых могут быть обнаружены эти грибы (Ingold, 1942, 1943a, 1943b, 1954, 1959a, 1959b, 1966; Ranzoni, 1953; Nilsson, 1958, 1964; Дудка, 1961, 1964, 1965, 1968, 1974; Petersen, 1962, 1963a, 1963b; Арнольд, 1968; Crane, 1968; Conway, 1970, и др.). Отбираемые листья тщательно отмывают в водоеме от ила и детрита, после чего без воды помещают в широкогорлые стеклянные или полистиленовые сосуды, иногда в полистиленовые мешочки. В них листья хранят до лабораторной обработки при возможно низких температурах — не выше 10° (Crane, 1968) и не более нескольких недель (Арнольд, 1968). Однако имеются сведения, что листья в полистиленовых мешочках могут сохраняться в течение нескольких месяцев и при этом развившиеся на них водные гифомицеты не утрачивают жизнеспособности (Nilsson, 1962). Иногда для отбора листьев из водоема применяется специальное приспособление — длинная (1.5 м) рукоятка с гнездом на одном конце, в которое вставляют широкогорлый сосуд и им как сачком собирают листья (Crane, 1968). Аналогичным образом собирают из водоемов и другие субстраты, на которых развиваются водные гифомицеты, в частности веточки деревьев и кустарников (Perrott, 1960b; Petersen, 1960; Webster, 1961; Price, Talbot, 1966; Archer, Willoughby, 1969, и др.). В отдельных случаях

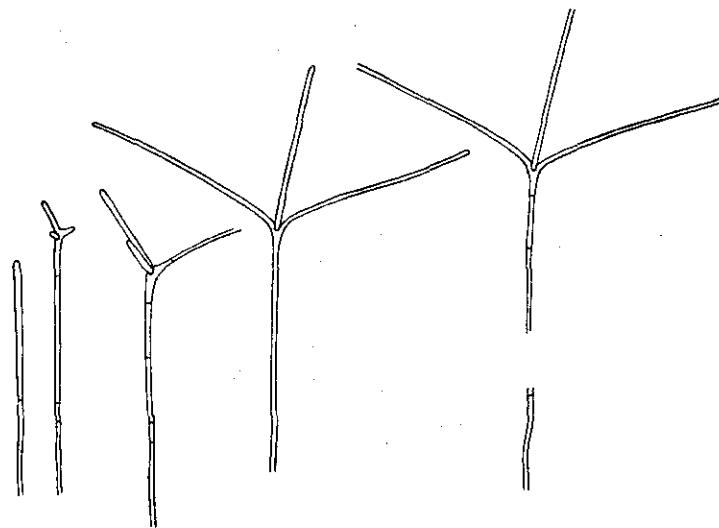


Рис. 11. Стадии развития и освобождения спор у водного гифомицета *Tetrachaetum elegans*.

(необходимость установления пригодности того или иного субстрата для заселения водными гифомицетами; отсутствие или незначительное количество в исследуемом водоеме гниющих и скелетонизированных листьев и т. д.) применяется метод приманок. В качестве приманок обычно используются ошавшие листья различных древесных пород, которые погружают в водоем в мешочках из грубой перлоновой материи (Арнольд, 1968), или же блоки и панели древесины, погружаемые в водоем на нейлоновой веревке, один конец которой закрепляют на берегу или привязывают к буйку, а другой заякоривают (Jones, Oliver, 1964; Jones, 1965; Kirk, 1969).

Пену и пленку из водоема, которые благодаря возникающему в них поверхностному натяжению служат прекрасными «ловушками» для конидий водных гифомицетов, собирают разными способами. Чаще всего их непосредственно из водоема отбирают в стеклянные сосуды — пробирки или бутылки (Ingold, Ellis, 1952; Ingold, 1956, 1959c, 1965, 1967, 1968; Nilsson, 1964; Арнольд, 1968; Дудка, 1968, 1971, 1974; Crane, 1968, и др.), реже отбор проб пены и пленки производится с помощью планктонной сетки (Tubaki, 1960). Планктонную сетку (60×30 см) с прикрепленной внизу пробиркой в течение 10–30 мин. протягивают по поверхности ручья в тех его участках, где скапливаются пена и пленка, а затем содержимое пробирки переливают в сосуд для хранения пробы. Пробы пены и пленки доставляют в лабораторию и сразу же или после непродолжительного хранения в холодильнике просматривают под микроскопом. Более длительное хранение нефиксиро-

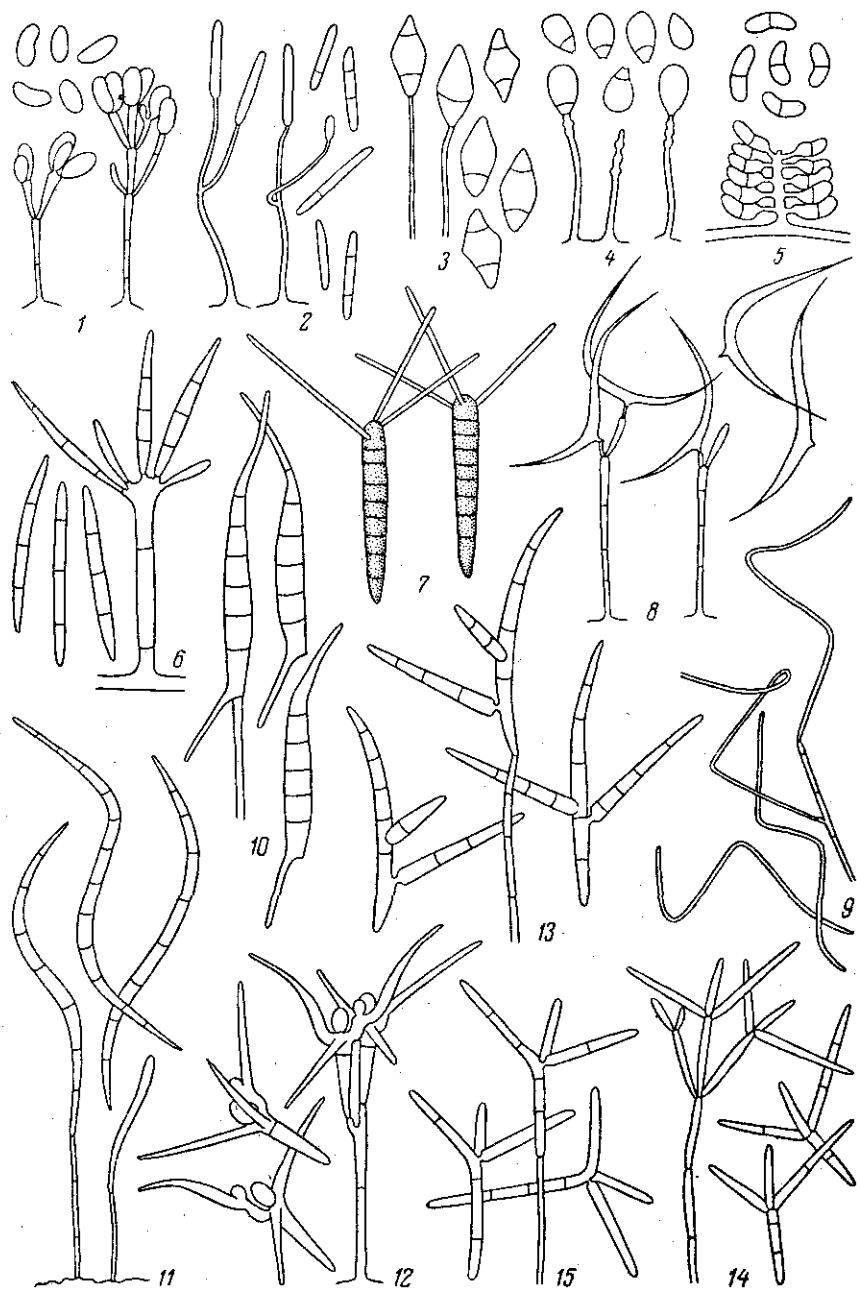


Рис. 12. Виды водных гифомицетов (пор. *Hyphomycetales*), конидиеносцы и конидии.

1 — *Dimorphospora foliicola*; 2 — *Bacillispora aquatica*; 3 — *Dactylella aquatica*; 4 — *Monotosporella microaquatica*; 5 — *Neta patuxentica*; 6 — *Dactylaria fusiformis*; 7 — *Campylosporium antennatum*; 8 — *Lunulospora curvula*; 9 — *Anguillospora aquatica*; 10 — *Centrospora acerina*; 11 — *Anguillospora longissima*; 12 — *Tetracladium marchalianum*; 13 — *Tricladium splendens*; 14 — *Articulospora tetracladia*; 15 — *Geniculospora inflata*;

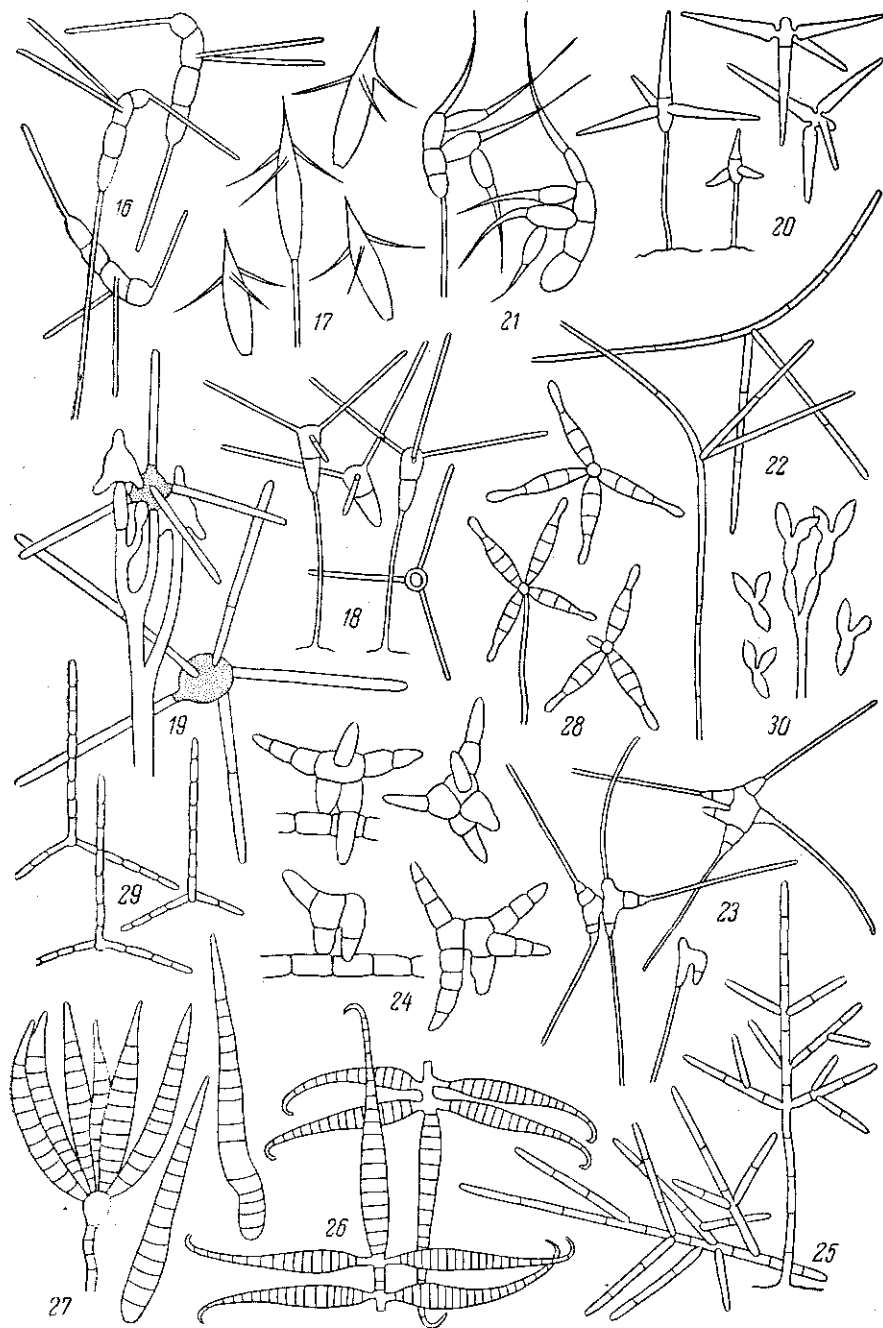


Рис. 12 (продолжение).

16 — *Culicidospira aquatica*; 17 — *Jaculispora submersa*; 18 — *Clavariopsis aquatica*; 19 — *Actinospora megalospora*; 20 — *Triscelophorus monosporus*; 21 — *Gyoerffyella craginiformis*; 22 — *Tetrachaetum elegans*; 23 — *Campylosporium chaetocladia*; 24 — *Tripaspermum myrtii*; 25 — *Dendrospora erecta*; 26 — *Casaresia sphagnum*; 27 — *Tetracrium amphibium*; 28 — *Flabelliospora crassa*; 29 — *Trisulcosporium acerinum*; 30 — *Tricellula aquatica*;

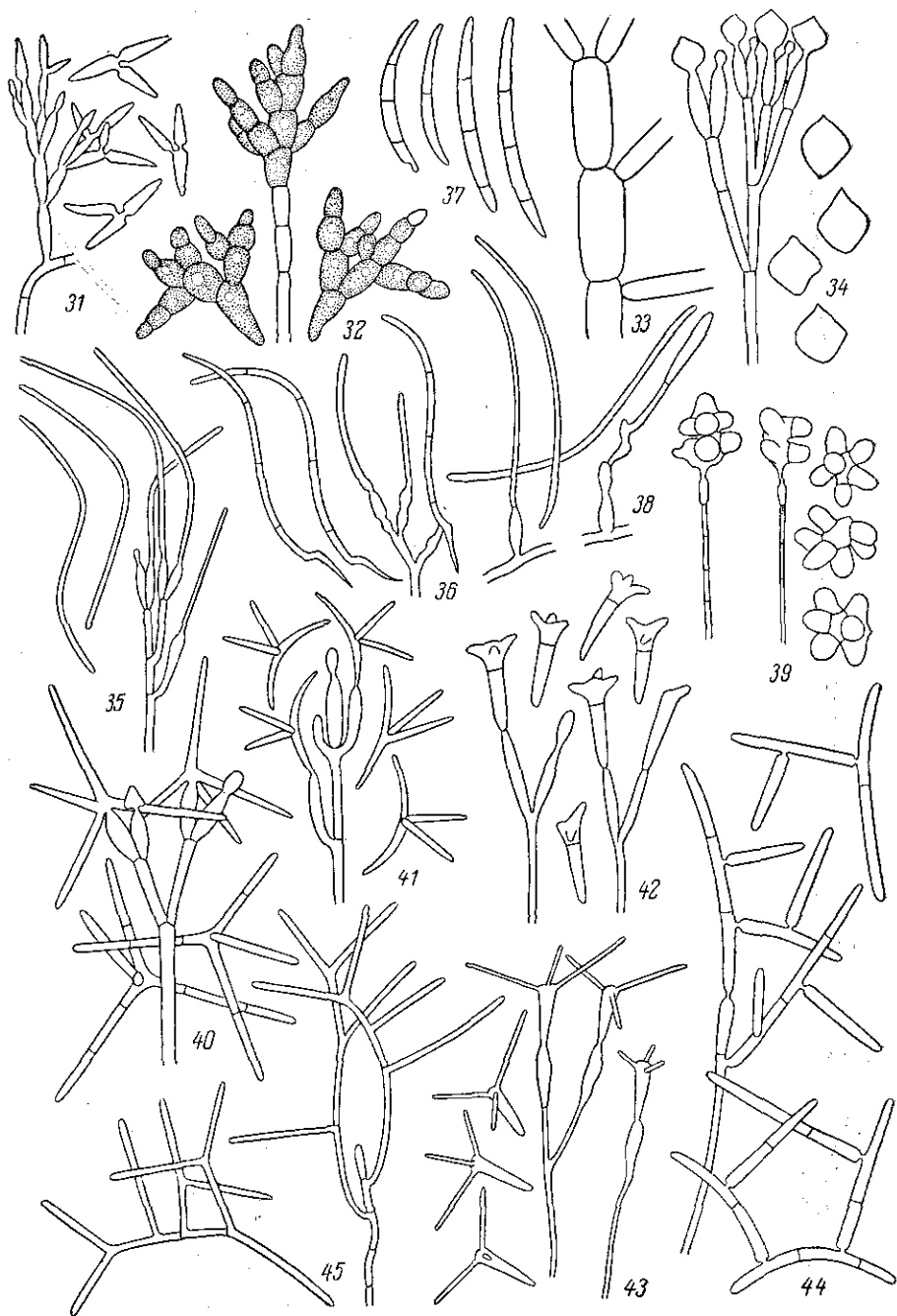


Рис. 12 (продолжение).

31 — *Volucrispora aurantiaca*; 32 — *Speiropsis irregularis*; 33 — *Saprochaete saccharophila*, часть таллома; 34 — *Margaritispora aquatica*; 35 — *Flagellospora curvula*; 36 — *Calceari-spora hiemalis*; 37 — *Fusarium aqueductum*; 38 — *Sigmaidea prolifera*; 39 — *Pyramidospora casuarinae*; 40 — *Lemonniera aquatica*; 41 — *Alatospora acuminata*; 42 — *Heliscus lugdu-nensis*; 43 — *Clavatospora longibrachia*; 44 — *Varicosporium elodeae*; 45 — *Polycladium equiseti*.

ванных проб недопустимо, так как в них наблюдается обильное развитие бактерий и прорастание грибных спор (Nilsson, 1964; Арнольд, 1968). Для более длительного хранения проб пены и пленки (обычно это пробы, предназначенные для количественной обработки) их фиксируют раствором Люголя * (Nilsson, 1964; Арнольд, 1968), раствором Люголя со 100%-й ледяной уксусной кислотой (Willén, 1958; Nauwerck, 1959) или 4%-м раствором формалина (Nauwerck, 1959; Дудка, 1971).

Существует еще один способ сбора водных гифомицетов — улавливание конидий с помощью предметных стекол, покрытых слоем питательной среды (Tubaki, 1960; Арнольд, 1968). Стекла, покрытые слоем 3%-го агара, обычно размещают в месте падения водопадов, там, где в воздухе постоянно стоит водяная пыль, состоящая из мельчайших брызг воды. Их располагают на расстоянии от 1 до 20 м в зависимости от величины водопада. Время экспозиции 30 мин. За это время конидии водных гифомицетов, приносимые брызгами воды, оседают на стеклах с агаром и при последующем микроскопировании сравнительно легко обнаруживаются и идентифицируются.

В какой-то мере сходен с вышеописанным способом сбора водных гифомицетов на предметные стекла и в то же время существенно отличается от него метод «пластин обростания», предложенный Сладечковой (Sládečková, 1963). Пластины площадью 144 см², изготовленные из различных материалов (твердая и мягкая древесина, плексиглас, пластики разных сортов и фарфор), погружают на 20–25 см ниже уровня воды в исследуемый водоем и извлекают их оттуда через определенные промежутки времени (от нескольких дней до месяца). Обростания, в изобилии развивающиеся на этих пластинах, соскребают и исследуют под микроскопом на наличие конидий водных гифомицетов.

Обработка проб скелетонизированных листьев и других собранных в водоемах субстратов перед выделением из них чистых культур водных гифомицетов производится следующим образом. В лаборатории субстраты тщательно отмывают от грязи и детрита. Для этой цели преимущественно пользуются дистиллированной водой (Арнольд, 1968; Crane, 1968; Conway 1970), но вполне пригодна также водопроводная вода (Alasoadura, 1968a, 1968b). Отмытые листья помещают в неглубокие чашки Петри со стерильной водой, которая тонким слоем покрывает листья. Эти чашки инкубируют при 20–22° для накопления культуры гриба (Ingold, 1943a; Ranzoni, 1953; Tubaki, 1957; Suzuki, Nimura, 1960a, 1960b, 1961; Alasoadura, 1968a; Conway, 1970). Кроме того, при инкубации листьев также используется и дождевая вода (Арнольд, 1968) или стерильная прудовая вода (Crane, 1968). Продолжительность инкубации зависит от того, подвергаются ли скелетонизированные

* Кристаллического йода 1 г, иодистого калия 2 г и дистиллированной воды 300 мл.

листья азарии или пет. Если листья, предназначенные для накопления культуры гриба, аэрируются, то срок инкубации всего несколько дней — от 2 до 5—7 (Hudson, Ingold, 1960; Ingold, 1960; Greathead, 1961; Alasoadura, 1968a; Woelkerling, Baxter, 1968; Marvanová, Marvan, 1969; Conway, 1970); если же азария отсутствует, то срок инкубации сокращается до 12—24 час. (не более 2 дней) (Ranzoni, 1953; Nilsson, 1958; Suzuki, Nimura, 1960a, 1961; Greathead, 1961). В результате инкубации на скелетонизированных листьях в изобилии развиваются конидиеносцы и конидии водных гифомицетов, которые легко обнаруживаются при просмотре листьев под стереомикроскопом на малом увеличении (15×3). Листья просматривают или прямо в воде, или приготовляют препараты в лактофеноле. Препараты в лактофеноле с хлопковым синим* (Suzuki, Nimura, 1960a, 1960b, 1961; Nilsson, 1964; Conway, 1970) и в лактофеноле с кислым фуксином (Crane, 1968) используются как постоянные.

Веточки деревьев и кустарников, извлеченные из водоемов, инкубируют в лаборатории не в чашках с водой, а во влажной камере. Этот метод оказался наиболее эффективным для данного субстрата. При просмотре под стереомикроскопом (МБС-2) ветвей, выдержанных во влажной камере 3—4 недели, на них наблюдается обильное развитие грибов, в том числе водных гифомицетов (Archer, Willoughby, 1969).

Получение чистых культур. Выделение чистых культур, развивающихся на скелетонизированных листьях и других субстратах, также производится во время просмотра этих субстратов под стереомикроскопом. Прокаленной в пламени горелки иглой (Tubaki, 1957; Webster, 1959a; Iqbal, Webster, 1969) или капиллярной пипеткой (Tubaki, 1957; Webster, 1959b; Арнольд, 1968; Crane, 1968) отдельные конидии улавливают из воды и переносят на агаризованную среду.

П и т а т е л ь н ы е с р е д ы. Наиболее распространенной средой неопределенного химического состава для выделения и культивирования водных гифомицетов является мальц-агар, в состав которого входят 2% мальц-экстракта и 2% агара, иногда количество мальц-экстракта уменьшают до 1% (Ingold, 1942, 1943a, 1958, 1964; Ranzoni, 1951, 1953; Ingold, Cox, 1957a; Webster, 1959a, 1959b, 1961, 1965b; Petersen, 1960; Greathead, 1961; Crane, 1968; Ingold et al., 1968; Marvanová, 1968; Iqbal, Webster, 1969, и др.). Обычно мальц-агар готовят на дистиллированной воде, однако для выделения водных гифомицетов более подходящей является среда, приготовленная на речной воде (Webster, 1959a, 1961, 1965b; Greathead, 1961). Водные гифомицеты выделяют и культивируют, кроме того, и на таких обычных средах неопределенного состава, как агар с овсяной мукой (Ingold,

1942; Webster, 1959b; Petersen, 1960, 1962, 1963a, 1963b), картофельно-декстрозный агар (Karling, 1935b; Webster, 1959b; Iqbal, Webster, 1969), сливовый агар (Kegel, 1906; Karling, 1935b; Ranzoni, 1953; Дудка, 1961; Арнольд, 1968), агар с кукурузной мукой (Karling, 1935b; Webster, 1959b) и ряде других сред. Иногда для получения чистых культур водных гифомицетов используются такие универсальные среды, как среда Чапека—Докса, среда Сабуро, голодный агар, среда YpSs (Karling, 1935b; Ingold a. Cox, 1957a, 1957b; Арнольд, 1968; Ingold et al., 1968; Marvanová, 1968; Conway, 1970).

На указанных средах неопределенного химического состава выделены представители группы водных гифомицетов из родов *Lemonniera*, *Margaritispora*, *Clavariopsis*, *Heliscus*, *Tetracadium*, *Tetrachaetum*, *Alatospora*, *Tricladium*, *Varicosporium*, *Anguillospora*, *Lunulospora*, *Culicidospora*, *Speiropsis*, *Flagellospora*, *Centrospora*, *Triscelophorus* и др.

В последние годы для выращивания чистых культур водных гифомицетов разработаны более стандартизированные питательные среды, приближающиеся по своему составу к синтетическим, имеющим определенный химический состав. Одной из таких сред является среда Ранцони (Ranzoni, 1951), состоящая из глюкозы — 4.0 г, KH_2PO_4 — 0.1 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.02 г, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.002 г и дрожжевого экстракта (Difco) — 0.3 г на 100 мл дистиллированной воды. Среда Ранцони еще используется в другой модификации, в которой FeCl_3 заменен FeSO_4 и вместо 0.3 г дрожжевого экстракта берется 0.5 г. Эта же среда Ранцони в несколько ином количественном составе была использована для выращивания гифомицетов при изучении их потребности в различных источниках углерода: глюкоза (источник углерода) — 4.0 г, KH_2PO_4 — 1.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.2 г, FeCl_3 — 0.02 г, дрожжевой экстракт — 1.0 г на 1 л дистиллированной воды (Thornton, 1963). Иногда дрожжевой экстракт в этой среде заменяют 2 г аспарагина. Для изучения потребности водных гифомицетов в различных источниках азота эти грибы выращивают на питательной среде Ричарда (Zanardi et al., 1960), которая по компонентному составу сходна со средой Ранцони: глюкоза — 34.0 г, KH_2PO_4 — 5.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2.5 г, FeSO_4 — следы на 1 л дистиллированной воды. Кроме вышеуказанных компонентов в состав среды Ричарда обязательно входит какой-либо источник азота в виде $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 или различных аминокислот (глутаминовая кислота, аргинин, цистин, цистеин, гистидин, лейцин, аспарагиновая кислота, лизин, метионин, триптофан, пролин, валин, аланин, серин, фенилаланин или глицин), причем каждое из этих веществ берется в эквивалентных соотношениях, так чтобы содержание азота в среде составляло 0.25 М на 1 мл раствора. Для изучения азотного питания водных гифомицетов их культивируют также на среде Ранцони в модификации Торнтона (Thornton, 1963, 1965) без глюкозы: KH_2PO_4 — 1 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.2 г, FeCl_3 — 0.02 г,

* Хлопковый синий (или хлопчатобумажный синий) 4В или У4В употребляют в виде 1%-х водных или молочнокислых растворов. Время окрашивания от 30 сек. до 10 мин.

дрожжевой экстракт заменен биотином — 5 мкг и пантотеновой кислотой — 5 мкг на 1 л дистиллированной воды. В качестве одного из источников азота в состав этой среды входят NaNO_3 — 1.34 г, или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0.88 г, или одна из следующих аминокислот: L-аспарагиновая кислота — 1.75 г, L-лизин — 2.42 г, L-глутаминовая кислота — 1.94 г, L-тирозин — 2.40 г, аргинин — 0.69 г или гидролизат казеина — 1.32 г. В последнем варианте (Thornton, Fox, 1968) эта синтетическая среда для культивирования водных гифомицетов имеет следующий состав: глюкоза — 8.0 г, KH_2PO_4 — 1.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.2 г, FeCl_3 — 0.02 г, биотин — 5 мкг, пантотеновая кислота — 5 мкг на 1 л воды. В качестве источника азота в среду вводят глутаминовую кислоту — 1.94 г, тирозин — 2.40 г или сульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0.88 г; pH питательных сред для культивирования водных гифомицетов 5.5—6.0. Для культивирования водных гифомицетов используется еще одна стандартная среда — среда Миуры (LCA), которая состоит из глюкозы — 1.0 г, KH_2PO_4 — 1.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.2 г, KCl — 0.2 г, NaNO_3 — 2.0 г, дрожжевого экстракта — 0.2 г, агара — 13.0 г на 1 л дистиллированной воды.

Для изучения целлюлазной активности водных гифомицетов используется среда Фриза в модификации Нильсона (Nilsson, 1964), в состав которой входят следующие ингредиенты: глюкоза — 20.0 г, NH_4NO_3 — 5.0 г, KH_2PO_4 — 1.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5 г, NaCl — 0.1 г, CaCl_2 — 0.1 г, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 4.43 мг, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 4.0 мг, тиамин — 100 мкг, пиридоксин — 100 мкг, дистиллированная вода — 1 л.*

На средах Ранцони, Ричарда, на среде Ранцони в модификации Торнтона культивируют водные гифомицеты из родов *Anguillospora*, *Articulospora*, *Flagellospora*, *Heliscus*, *Lemonniera*, *Tricladium*, *Tricellula*, *Varicosporium*.

На средах неопределенного химического состава водные гифомицеты, как правило выращивают в стационарных условиях, реже на качалке (Thornton, 1963) при комнатной температуре не выше 23—24°, так как уже при 27° рост грибов прекращается (Арнольд, 1968). На полусинтетических и синтетических средах грибы выращивают как в стационарных условиях, так и на качалках. Инокуляцию сред производят 2—3 каплями гомогенизированной мицелия, инкубируют культуры в конических колбах (емкостью 100 и 250 мл) с 20 мл и 50 мл среды, размещенных на качалках, при 90—100 об./мин. в течение 10—11 дней при различной температуре от 15 до 23° (Thornton, 1963; Thornton, Fox, 1968).

При культивировании водных гифомицетов на твердых питательных средах различного состава подавляющее большинство видов дает только мицелиальный рост, не образуя спороношений

* Синтетические и полусинтетические среды для культивирования водных гифомицетов обычно стерилизуют автоклавированием, как и среды неопределенного химического состава, но иногда стерилизация их производится путем фильтрации через фильтры Зейца (Thornton, 1963).

Для получения спороношений, которые необходимы при идентификации грибов, как илюкулюм при получении односпоровых культур и т. д., рекомендуется кусочки агара с мицелием из колоний водного гифомицета перенести в стерильную дистиллированную воду (Ingold, 1942; Petersen, 1960, 1962, 1963a, 1963b; Anastasiou, 1964; Webster, 1965b, и др.). По данным Инголда (Ingold, 1942), обильное образование конидий начинается через 24—28 час. Аналогичные результаты получают, перепосы полоски или кусочки агара с мицелием гриба в водопроводную воду (Iqbal, Webster, 1969). Марванова помещала агар с мицелием водных гифомицетов в чашки под крап с медленно капавшей водопроводной водой (Marvanová, 1968). В этом случае обильное спороношение наблюдается через 3—4 дня. При погружении кусочков агара с мицелием водных гифомицетов в глубокие чашки Петри со стерильной прудовой водой образование конидий отмечено через 2—10 дней (Crane, 1968).

Примечание. Существующие методы сбора, выделения и культивирования водных гифомицетов, являющихся типично сапрофитной группой грибов и развивающихся на погруженных в воду растительных субстратах, преимущественно скелетонизированных или гниющих листьях различных древесных пород, разработаны основательно и вполне обеспечивают изучение видового состава, экологических и физиологических особенностей этих грибов. Дальнейшее совершенствование методов исследования водных гифомицетов должно продолжаться по пути разработки универсальных синтетических сред для их культивирования.

Способы очищения культур водных гифомицетов от бактериального загрязнения. Конидии водных гифомицетов прорастают на питательной среде через несколько часов, однако им часто сопутствует бактериальное загрязнение. Для подавления роста бактерий к питательным средам, на которых выделяют водные гифомицеты, добавляют антибиотики: стрептомицин и канамицин (Petersen, 1960; Conway, 1970). Наиболее оптимальные результаты при этом дает следующая процедура. Каплю воды с конидиями капиллярной пипеткой переносят на голодный агар с канамицином (55 мг антибиотика на 100 мл среды). Инокулированные чашки в течение 24 час. инкубируют при 20°, а затем просматривают под микроскопом с небольшим увеличением для обнаружения прорастающих конидий. Эти конидии стерильной иглой перепосы на другую чашку с голодным агаром и антибиотиком, а затем культуру с голодного агара пересевают на агаризованную среду с глюкозой, пептоном и дрожжевым экстрактом или на мальц-агар (Conway, 1970).

Существует и другой способ освобождения культур водных гифомицетов от бактериального загрязнения, путем применения колец Ван Тигема по Реперу (Raper, 1937; Ranzoni, 1953; Crane, 1968). Нижний край стеклянного кольца в нескольких местах надрезается на глубину 1—2 мм, кольцо помещают в центр чашки Петри, стерилизуют их и в чашку наливают питательную среду,

уровень которой немного выше, чем надрезы кольца. Питательную среду инокулируют каплей воды с конидиями водных гифомицетов в центр кольца. Мицелий вырастает в глубь агара и через надрезы выходит за пределы кольца на поверхность агаровой пластинки. Гифы, выходящие за пределы кольца, большей частью свободны от бактерий. Их и используют в качестве инокулюма для получения чистых культур грибов.

МЕТОДЫ СБОРА, ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ ИЗ СТОЧНЫХ ВОД И ЗАГРЯЗНЕННЫХ СТОКАМИ ПРЕСНЫХ ВОДОЕМОВ

Происходящий в последние десятилетия интенсивный рост предприятий металлургической, химической, бумажной и других отраслей промышленности и рост населенных пунктов обуславливают увеличение количества промышленных и бытовых стоков, поступающих в водоемы. Это выдвигает на повестку дня вопросы установления степени загрязнения водоемов, в том числе с помощью организмов-индикаторов, вопросы разработки методов очистки сточных вод и загрязненных ими рек, озер, прудов как химическими, так и биологическими путями. Первым этапом в решении этих вопросов для микологов является выяснение видового состава организмов, встречающихся в этой специфической водной среде, в том числе и микроскопических грибов.

Сбор. Метод приманок, метод непосредственного микроскопирования обрастаний и другие позволяют выявить в сточных водах и загрязненных ими водоемах весьма немногочисленные виды облигатных водных грибов-сапрофитов, в основном из класса *Phycomycetes*: ряд видов родов *Achlya* и *Saprolegnia* из пор. *Saprolegniales*, *Leptomitius lacteus* из пор. *Leptomitales*, ряд видов рода *Pythium* из пор. *Peronosporales* (Kolkwitz, 1901, 1903; Tiegs, 1919; Butcher, 1932; Павлинова, 1933, 1935, 1952; Каныгина, 1935; Разумов, 1935, 1953; Schade, 1940; Schade, Thimann, 1940; Harvey, 1952; Cooke, Bartsch, 1959; Коколия, 1963, 1967а, 1967б; Раскина, 1963; Дудка, 1966; Мещерякова, Логвиненко, 1968; Логвиненко, 1970; Мещерякова, 1970, и др). Как показали дальнейшие исследования, незначительное количество видов грибов, обнаруженных в этих местообитаниях с помощью метода приманок и непосредственного микроскопирования обрастаний, объясняется тем, что применявшиеся методы не позволяли выявить в изобилии встречающиеся в сточных водах и загрязненных ими водоемах почвенные плесневые грибы. Эти грибы не являются облигатными водными обитателями и тем не менее, попадая в воду из воздуха, почвы, вместе с отходами производства, они могут завершить свой жизненный цикл в водных условиях (Cooke, 1961). Попытки посева сточных вод и вод из загрязненных водоемов на агаризованные

среды длительное время были безуспешными, так как богатая бактериальная флора, характерная для промышленных и бытовых стоков, развивалась на питательных средах быстрее, чем грибы и таким образом тормозила, а в большинстве случаев совсем прекращала их развитие. В 1952 г. Гарвей (Harvey, 1952) предложил для угнетения бактерий добавлять к питательным средам (для выделения грибов из сточных вод он использовал картофельно-декстрозный агар и агар с кукурузной мукой) антибиотики — стрептомицин, пенициллин или актидион. Идею Гарвея поддержал Кук (Cooke, 1954b, 1954c), разработавший в деталях специальную методику сбора, выделения и культивирования плесневых грибов из сточных вод и загрязненных стоками водоемов, которая в настоящее время широко применяется при изучении грибов из этого специфического местообитания. Согласно методике Кука, пробы воды, ила, слизи, обрастаний и т. д. отбираются в 100-миллилитровые жестяные банки; причем при отборе проб воды в сосуд вместе с водой помещают слизь, которую лопаточкой или шпателем соскребают с погруженных в воду камней, бревен, свай. После отбора проб их доставляют в лабораторию и в тот же день обрабатывают. Обработка проб заключается в том, что их высевают в чашки Петри на питательную среду соответствующего состава.

Культивирование. Питательные среды. Кук (Cooke, 1954b, 1954c) испытал несколько сред, чтобы выбрать наиболее подходящую для выделения и культивирования грибов сточных и загрязненных вод. В их числе были: «микологический» агар, в состав которого входят декстроза — 10.0 г, сойтон Difco — 10.0 г, агар — 15.0 г на 1 л дистиллированной воды; среда Литтмана следующего состава: глюкоза — 10.0 г, пептон — 10.0 г, бычья желчь (или оксгалл) — 15.0 г, агар — 20.0 г на 1 л дистиллированной воды с добавлением 0.01 г кристаллического фиолетового и 70.0 мкг стрептомицина на 1 мл); агар с почвенным экстрактом, куда добавляются декстроза — 10.0 г, NaNO_3 — 1.0 г, K_2HPO_4 — 1.0 г, агар — 20.0 г на 1 л почвенного экстракта (приготавливается автоклавированием 350 г почвы в 750 мл воды, полученная смесь фильтруется и 1 л фильтрата добавляется к компонентам среды) с добавлением 70.0 мкг стрептомицина на 1 мл; среда Ваксмана в модификации Мартина и др. Последняя среда оказалась наиболее благоприятной для выделения и культивирования грибов сточных и загрязненных вод. Среда Ваксмана, в состав которой входят декстроза — 10.0 г, пептон — 5.0 г, KH_2PO_4 — 1.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5 г, агар — 20.0 г на 1 л дистиллированной воды, применяется для выделения и культивирования почвенных грибов (Waksman, 1922). Мартин (Martin, 1950) модифицировал эту среду, добавив к ней 30.0 мкг стрептомицина (на 1 мл) и, кроме того, 0.035 г розового бенгальского (на 1 л), относительно которого установлено, что он является хорошим ингибитором роста бактерий и актиномицетов (Smith, Dawson, 1944). Кук (Cooke, 1954b, 1954c) вначале использовал для выделения и культивирования

грибов сточных вод среду Ваксмана в модификации Мартина, а затем внес некоторые изменения в ее состав, и в дальнейшем для работы с грибами сточных и загрязненных вод стандартной стала среда Ваксмана—Мартина в модификации Кука следующего состава: декстроза — 10.0 г, сойтон — 5.0 г, KH_2PO_4 — 1.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5 г, агар — 20.0 г с добавлением 0.035 г розового бенгальского на 1 л воды и 35.0 мкг ауреомицина на 1 мл. Из четырех исследованных Куком антибиотиков (стрептомицин, ауреомицин, тетраамицин, хлоромипетин) лучшим ингибитором бактерий оказался ауреомицин, несколько худшим стрептомицин, который подавлял не все виды бактерий; последние два антибиотика подавляли развитие бактерий из сточных и загрязненных вод значительно слабее, чем первые два. Для приготовления раствора антибиотика 1.0 г его смешивают с 150 мл стерильной дистиллированной воды в колбе Эрленмейера. Раствор может храниться в холодильнике в течение 2 месяцев (Cooke, 1954b, 1954d).

Кроме среды Ваксмана—Мартина—Кука вполне пригодными для выделения грибов из сточных вод оказались «микологический» и «микфильный» агары, а также среда с гидролизатом казеина (Cooke, 1954b). Остальные испытанные среды (Сабуро, Конна, Литтмана и др.), хотя и обеспечивали в ряде случаев даже лучший рост исследуемых грибов, чем среда Ваксмана—Мартина—Кука, «микологический» и «микфильный» агары, однако не подавляли развития бактерий (Cooke, 1954b, 1963).

В настоящее время питательные среды, впервые примененные для выделения и культивирования грибов из сточных вод Куком, широко используются при изучении микофлоры стоков и загрязняемых ими водоемов. Хорошие результаты получены не только на стандартной среде Ваксмана—Мартина—Кука (Becker, Shaw, 1955; Ottová-Svobodová, 1962), но также на среде Ваксмана в модификации Мартина с глюкозой вместо декстрозы (Ottová, Sladká, 1966; Sladká, Ottová, 1968).

Список сред, которые были отмечены Куком (Cooke, 1954b) как пригодные для выделения и культивирования грибов из сточных вод и загрязненных ими водоемов, в процессе исследования этих грибов значительно пополнился. Бекер и Шоу (Becker, Shaw, 1955) успешно выделяли грибы из бытовых сточных вод на среде с глюкозой (22.0 г) и виннокаменной кислотой (4.0 г), в состав которой также входят триптон — 8.0 г, сойтон — 2.0 г, дрожжевой экстракт — 1.0 г и агар — 15.0 г на 1 л дистиллированной воды. Глюкоза и виннокаменная кислота стерилизуются отдельно от остальных компонентов среды и добавляются к ним перед разливом среды в чашки Петри. Вполне пригодна для выделения и культивирования грибов из сточных и загрязненных вод среда Чапека—Докса с кукурузным экстрактом и травяной агар (Ottová, Sladká, 1966; Sladká, Ottová, 1968).

Все вышеперечисленные питательные среды являются средами неопределенного химического состава. В 1968 г. для выделения

и культивирования грибов из сточных вод и загрязняемых ими водоемов была разработана синтетическая среда (Tabak, Cooke, 1968), в состав которой входят KH_2PO_4 — 1.0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5 г, KCl — 0.5 г, тиамин — 100 мкг и биотин — 5 мкг на 1 л дистиллированной воды. Кроме указанных компонентов к среде добавляют один из четырех источников азота: аспарагин, глицин, NH_4NO_3 или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в количестве 2 г на 1 л воды и 1 мл раствора микроэлементов; раствор микроэлементов готовят из $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 100 мкг, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 88 мкг, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 40 мкг, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 15 мкг, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ — 10 мкг, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 5 мкг, которые растворяют в 100 мл дистиллированной воды (обычно берут этот раствор в количестве 1 мл на 1 л среды); pH этой среды 3.5—4.

При посеве проб сточных и загрязненных вод и илов на питательные среды обычно применяется метод разведений. Пробу предварительно перемешивают пипеткой и переносят по 15 мл в стерильные колбы Эрленмейера (объемом 250 мл) со 150 мл дистиллированной воды. Полученные образцы (разведение пробы 1 : 10) помещают на качалку (150 об./мин.) и выдерживают там в течение 15—30 мин. Затем пипеткой отбирают 5 мл раствора и переносят его в другую колбу Эрленмейера с 45 мл дистиллированной воды, получая разведение проб 1 : 100. Предварительные исследования микофлоры сточных и загрязненных вод свидетельствуют, что оптимальным разведением проб воды для наиболее полного выявления видового состава грибов является 1 : 100, а разведения 1 : 1000 и 1 : 10000 применяются либо в случае высокой концентрации сточных вод, либо тогда, когда в пробах мало воды и много ила (Cooke, 1954b, 1968). Посев на питательную среду пробы сточной или загрязненной воды или ила производится следующим образом. Среда Ваксмана—Мартина—Кука разливают в пробирки по 10 мл и стерилизуют. К среде в пробирках добавляют антибиотик. Пипеткой отбирают 0.1 мл раствора, содержащего 35 мкг ауреомицина, и переносят в пробирку со средой. Одновременно в пробирку добавляют 1 мл разведенной пробы. После этого инокулированную среду из пробирок переливают в стерильные чашки Петри, которые инкубируют при комнатной температуре. Максимальный срок инкубации 7 дней, после чего производится подсчет колоний и пересев грибов с чашек Петри на различные среды в пробирках. Ниже приводится состав некоторых сред (в граммах).

Глюкозный агар Сабуро

Глюкоза (или мальтоза)	40.0
Пептон	10.0
Агар-агар	15.0
Вода дистиллированная	1000 мл

Агар Литтмана с бычьей желчью

Пептон	10.0
Глюкоза	10.0
Бычья желчь (или оксгалл)	15.0
Агар-агар	20.0
Кристаллиолет	0.01
Вода дистиллированная	1000 мл

Среда Чапева	
Сахароза	20.0
NaNO ₃	2.0
KH ₂ PO ₄	1.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5
KCl	0.5
FeSO ₄	0.01
Агар-агар	15.0—20.0
Вода дистиллированная	1000 мл

Среда Конна с аспарагином натрия	
Аспарагинат натрия	1.0
Сахароза (или глюкоза)	10.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
NaH ₂ PO ₄	1.5
KCl	0.1
CaCl ₂	0.1
FeCl ₃	Следы
Вода дистиллированная	1000 мл

Среда Чапека—Докса	
	30.0
	3.0
	1.0
	0.5
	0.5
	0.01
	15.0—20.0
	1000 мл

Сусло-агар	
Неохмеленное пивное сусло (раз- веденное водой 1:1 до 7—8° балл.)	1000 мл
Агар-агар	20.0—25.0

Предложенные Куком (Cooke, 1954b, 1963) методы сбора, выделения и культивирования плесневых грибов, широко распространенных в этом специфическом биотопе, послужили толчком для интенсивного изучения микофлоры стоков и загрязненных ими водоемов (Cooke, 1954a, 1954b, 1954c, 1954d, 1956, 1957, 1961, 1962, 1963, 1968; Becker, Shaw, 1955; Cooke, Kabler, 1955; Михалюк, 1958; Höhnk, 1958; Cooke, Bartsch, 1960; Suzuki, Nimura, 1960a, 1960b; Ottová-Svobodová, 1962; Ottová, 1964; Hawkes, 1965; Ottová, Sladká, 1966; Sladká, 1966; Sladká, Ottová, 1968; Cooke, Matsuura, 1969, и др.). В результате общее количество грибов, выделенных из вышеуказанных местообитаний, составляет в настоящее время около 150 видов, преимущественно представителей родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Mucor* и др. (Cooke, 1957).

Примечание. Описанные методы сбора, выделения и культивирования вместе с ранее упоминавшимися методами приманок и непосредственного микрофотографирования образцов позволяют наиболее полно выявить видовой состав микофлоры сточных вод и загрязненных ими водоемов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕСНОВОДНЫХ ГРИБОВ-ПАЗАРИТОВ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО СБОРУ, ВЫДЕЛЕНИЮ И КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ГРИБОВ-ПАЗАРИТОВ ИЗ КЛАССА PHYCOMYCETES

Среди грибов-фикомицетов из разных порядков, населяющих пресные водоемы различных типов, большой процент составляют виды, развивающиеся как облигатные паразиты высших водных растений, водорослей, других водных грибов, а также водных беспозвоночных. В основном это представители порядков *Chytri-*

diales, *Hyphochytriales*, *Blastocladales*, *Plasmodiophorales*, *Lagenidiales* и некоторых других. Данные по паразитным водным фикомицетам из этих порядков суммированы в монографии Сперроу (Sparrow, 1960). После выхода в свет этой работы продолжают появляться многочисленные сообщения о нахождении в пресных водоемах новых и редких видов фикомицетов — паразитов водорослей, беспозвоночных и других водных организмов (Paterson, 1962, 1963; Karling, 1966b, 1970; Rieth, 1967; Canter, 1968a, 1968b, 1968c, 1969, 1970; Dayal, Thakur, 1968; Dogma, Sparrow, 1969; Howard, Johnson, 1969; Johnson, 1969; Barr, 1970b; Lukavský, 1970, и мн. др.).

Несмотря на видовое и количественное обилие фикомицетов, паразитирующих на различных организмах в пресных водоемах, методы их исследования разработаны недостаточно по сравнению с методами исследования сапрофитных фикомицетов. Такое положение в значительной мере объясняется трудностями, с которыми сталкивается исследователь паразитных фикомицетов, особенно при выделении их в чистую культуру. Иногда в случае устойчивого облигатного паразитизма и строгой специализации по отношению к организму-хозяину получение одночленной чистой культуры гриба вообще невозможно. Таким образом, при разработке методов сбора, выделения и культивирования паразитных фикомицетов на первый план выдвигаются взаимоотношения между грибом-паразитом и организмом-хозяином.

Сбор. Методы сбора этих грибов сводятся к отбору организмов-хозяев, на которых они паразитируют. Питательные водоросли собирают маленькими драгами или вручную, а для сбора всего планктона как микроскопических водорослей, так и беспозвоночных используется классическое орудие для отбора планктонных проб — коническая сетка, состоящая из шелкового или нейлонового усеченного конуса, сверху нашитая на металлическое кольцо, а внизу имеющая металлический или стеклянный стаканчик, в котором концентрируется планктон (Жадин, 1960). Различия между планктонными сетками для сбора фитопланктона (диатомовые, десмидиевые, синезеленые и другие водоросли) и для сбора зоопланктона заключается в качестве шелка, который идет на изготовление этих сеток. Для отбора фито- и зообентоса используют различной конструкции скребки, драги, бентометры, дночерпатели (Жадин, 1960). Водные грибы, которые являются организмами-хозяевами для паразитных фикомицетов, принадлежат в основном к пор. *Saprolegniales* (сем. *Saprolegniaceae*) и пор. *Peronosporales* (сем. *Pythiaceae*). Методы их сбора изложены выше (стр. 31).

Микрофотографирование пресноводных грибов-паразитов (*Phycomycetes*) в тканях растения-хозяина или животного. Выявление грибов-паразитов проводят путем микрофотографирования организмов-хозяев в живом состоянии. Водоросли исследуют на наличие грибов-паразитов не позже, чем через 2—3 часа после отбора проб. Для обнаружения интраматричной части таллома гриба-

паразита рекомендуется слегка подогреть водоросли на предметном стекле в разведенном глицерине, хлоралгидрате или молочной кислоте, а затем окрасить их бисмарковым коричневым в растворе глицерина (Литвинов, 1953). Другой способ обнаружения водных грибов — паразитов водорослей — заключается в том, что собранный материал в виде небольших скоплений нитчатых водорослей или проб фитопланктона, богатых эвгленовыми или десмидиевыми водорослями, сразу же после сбора помещают в неглубокие чашки Петри и ставят на рассеянном свете. Через несколько дней на водорослях в этих чашках начинают обильно развиваться хитридиевые и другие грибы-паразиты (Sparrow, 1960). Оба этих метода применяются для выявления паразитных, узкоспециализированных фикомицетов. Фикомицеты (в основном это представители пор. *Chytridiales*), приуроченные к более широкому кругу водорослей-хозяев, могут быть обнаружены следующим образом: в культуру водорослей из порядков *Zygnematales*, (*Conjugatae*), *Oedogoniales* и *Cladophorales* — больше других подходит для этой цели *Cladophora* — добавляют пыльцу, растительные остатки, отобранные из пробы воды исследуемого водоема. Через несколько дней в такой культуре с приманкой, роль которой выполняет водоросль, обильно развиваются грибы-паразиты (Sparrow, 1960). В последнее время набор водорослей-приманок значительно увеличился: с успехом используются в качестве приманок еще и микроводоросли, например представители родов *Pediastrum*, *Coelastrum*, *Sorastrum*, *Hydrodictyon* (Pater-son, 1963). Этот метод послужил основой для разработки метода двучленных культур.

Для обнаружения водных грибов-фикомицетов, которые являются гиперпаразитами филamentosных водных грибов из родов *Achlya* и *Saprolegnia* (пор. *Saprolegniales*), а также *Pythium* (пор. *Peronosporales*), применяется прямая микроскопия нитей грибов-хозяев из старых водных культур. Путем непосредственного микроскопирования экземпляров беспозвоночных из проб планктона и бентоса можно выявить грибы-паразиты на этих организмах.

Приготовление постоянных препаратов водных грибов-паразитов (*Phycomycetes*) из разных порядков. Наиболее распространенным методом сохранения обнаруженных фикомицетов — паразитов водорослей — вместе с организмом-хозяином является приготовление постоянных препаратов. Существует несколько способов. Согласно одному из них, микроскопические препараты организма-хозяина вместе с грибом-паразитом фиксируют слабым раствором уксусной кислоты, затем отмывают и под покровное стекло вводят эозин в 10%-м растворе глицерина. Таким образом, вводя под покровное стекло глицерин, добиваются полного замещения воды, после чего края покровного стекла прикрепляют к предметному стеклу цементом. Иногда вместо эозина и глицерина можно использовать лактофенол Амагна с кислым

фуксином или хлопчатобумажным синим (Sparrow, 1960). Два других метода приготовления постоянных препаратов предложены Бартчем (Sparrow, 1960). Один из них, более пригодный для грибов — паразитов нитчатых водорослей, заключается в том, что материал фиксируют в смеси 5 мл ледяной уксусной кислоты, 5 мл 40%-го формалина и 90 мл 50%-го этилового спирта в течение трех дней. Через три дня материал начинают отмывать, добавляя в небольшие бутылочки с фиксированными нитями маленькие порции воды. Бутылочки осторожно встряхивают и затем воду сливают. Процедура продолжается до тех пор, пока не исчезает запах уксусной кислоты. После этого бутылочки вновь наливают водой и добавляют 0.5%-й раствор железных квасцов. Через 12 час. раствор удаляют, а материал промывают в трех сменах воды. В бутылочки наливают 10 мл воды, к которой добавляют 7 капель 1%-го гематоксилина в 95° спирте. Исследуемый материал выдерживают в этом растворе в течение 3 дней, в результате чего он хорошо окрашивается. После окраски его несколько раз промывают водопроводной водой и помещают в 2%-й раствор квасцов. Через некоторое время раствор удаляют, промывают материал в 6 сменах воды и помещают его в 10%-й глицерин в открытые чашки Петри. Окончательное приготовление постоянных препаратов производится следующим образом: нить водоросли переносят в каплю глицерина на предметное стекло, покрывают покровным стеклом и заклеивают по краям бальзамом.

Другой предложенный Бартчем метод применяется для приготовления постоянных препаратов грибов, паразитирующих на планктонных водорослях. Пораженные грибом водоросли помещают в жидкость Циркла следующего состава: ледяная уксусная кислота — 45 мл, вода — 55 мл, глицерин — 5 или 10 мл, размельченный желатин — 10.0 г, FeCl_3 — 0.02 г, кармин — до насыщения. Готовят эту смесь, приливая к желатине воду до образования пастообразной массы; к этой массе затем добавляют глицерин, уксусную кислоту, FeCl_3 и кармин. Полученную смесь кипятят в течение 1 мин. и фильтруют. Помещенные в каплю этой смеси водоросли с грибом-паразитом покрывают стеклом и через полчаса заклеивают бальзамом.

Постоянные препараты представляют несомненную ценность, поскольку с их помощью в любой момент можно провести необходимые наблюдения по морфологии изучаемого организма. В то же самое время постоянные препараты имеют ряд минусов. Во-первых, на постоянном препарате может быть зафиксирован только один определенный этап из сложного цикла развития гриба-паразита. Во-вторых, само собой разумеется, что при этом методе невозможно исследовать физиологию гриба-паразита, его взаимоотношения с организмом-хозяином и другие вопросы, которые можно изучать только на живом объекте в естественных условиях или культуре. В связи с этим давно предпринимались по-

дытки выделения паразитных фикомицетов в чистую культуру на искусственных питательных средах, которые, однако, оставались безуспешными до тех пор, пока для культивирования фикомицетов — облигатных паразитов грибов и водорослей — не был предложен метод двучленных культур. Этот метод, основанный на строгой приуроченности гриба-паразита к организму-хозяину, заключается в том, что на питательной среде получают чистую культуру организма-хозяина вместе с паразитирующим на нем грибом.

Грибы пор. *Lagenidiales* (рис. 13)

Еще в 1939 г. Шенор (Shanor, 1939) получил чистую культуру гриба из рода *Olpidiopsis* (пор. *Lagenidiales*), паразитирующего на гифах сапролегниевых грибов. Правда, культура была получена не на питательной среде, а на семенах льна в стерильной воде. Для этого к культуре сапролегниевых грибов на стерильных семенах льна в чашках Петри со стерильной водой добавляют тщательно отмытую гифу гриба-хозяина с грибом-паразитом и таким путем получают чистую двучленную культуру. В дальнейшем предложенный Шенором метод получения двучленных культур лагенидиальных паразитных грибов из рода *Olpidiopsis* был усовершенствован (Slifkin, 1961, 1962, 1963, 1968).

Двучленные культуры. Гифы гриба-хозяина (*Saprolegnia* spp.) многократно отмывают, капиллярной пипеткой собирают выходящие из спорангиев зооспоры и переносят их на агар, чтобы очистить от бактерий. После этого собирают их пипеткой и переносят на агар с кукурузной мукой, где зооспоры, прорастая, дают мицелий. Вырезают часть мицелия, лишенную бактериального загрязнения, и пересевают в пробирки на агар с кукурузной мукой. Так получают чистую культуру гриба-хозяина. Далее из пробирок с чистой культурой гриба-хозяина извлекают часть мицелия, пересевают его в чашки Петри со стерильными семенами конопля в стерильной воде и выращивают 24-часовую водную культуру гриба-хозяина. Пораженную лагенидиевым грибом культуру *Saprolegnia* spp. тем временем тщательно отмывают, выходящие из спорангиев гриба-паразита зооспоры собирают капиллярной пипеткой и переносят их в 24-часовые водные культуры гриба-хозяина. Инфицированные таким образом 24-часовые культуры *Saprolegnia* spp. инкубируют в течение 1–2 дней при 23–25°. За это время на гифах сапролегниевых грибов начинается интенсивное развитие гриба-паразита и выход зооспор из его спорангиев. Эту искусственно зараженную культуру снова тщательно отмывают, собирают пипеткой зооспоры и переносят их в 24-часовую чистую водную культуру гриба-хозяина. На этот раз инфицированную культуру *Saprolegnia* spp. инкубируют в течение 4 час., после чего извлекают ее из

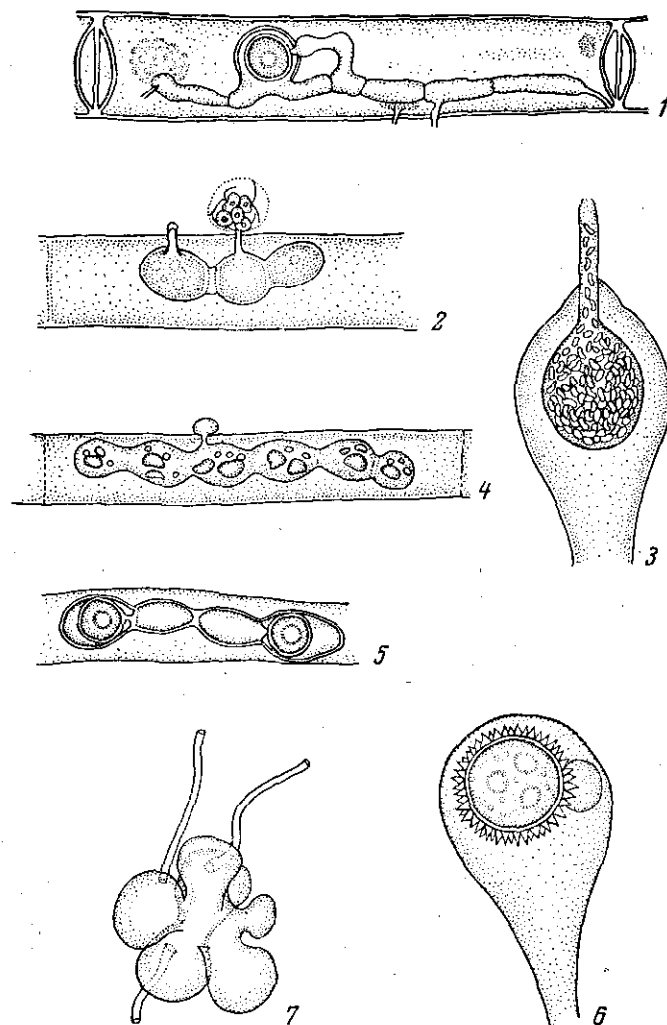


Рис. 13. Грибы пор. *Lagenidiales*.

1 — *Lagenidium rabenhorstii*, развитие гриба внутри водоросли *Spirogyra*, половые структуры; 2, 4, 5 — *Myzocyttium proliferum*, развитие гриба внутри водоросли *Conjugate*; 2 — спорангии и выходящие из спорангия зооспоры, 4 — сегментированный таллом гриба и зооспора с проникающей проростковой трубкой, 5 — развитие гриба внутри водоросли *Mougeotia*, оогонии гриба, имеющие по одной зооспоре; 3, 6 — *Olpidiopsis saprolegniae* var. *saprolegniae*, развитие микопаразитного гриба в гифе гриба *Saprolegnia* sp.: 3 — спорангий паразитного гриба во изогнутой гифе пораженного гриба, 6 — покоящаяся спора вместе с сопровождающей клеткой; 7 — *Petersenia pollagaster*, опустошенный спорангий с тремя выводными канальцами.

чашки вместе с семенем конопли, для удаления избытка воды помещают на стерильные чашки Петри с агаром, а затем пересевают мицелий на чашки с 2%-м агаром. Через 24 часа культура гриба-хозяина вместе с паразитом вырастает в среду, освобождаясь от бактериального загрязнения. Иногда для получения действительно чистой двучленной культуры пересев на чашки с 2%-м агаром необходимо повторить несколько раз (Slifkin, 1961, 1962).

Питательные среды. С помощью описанного выше метода удалось получить чистую двучленную культуру лагенидиевого гриба-паразита и сапролегниевое гриба-хозяина на среде определенного химического состава — среде Барксдейл (Barksdale, 1962b; Slifkin, 1963), состоящей из двух растворов. Раствор А: глутамат Na — 500 мг, глюкоза — 4.0 г, трис(оксиметил)аминометан — 500 мг. Раствор Б: натриевая соль ЭДТА (10 мг/мл) — 1 мл, цистин (20 мг/мл) — 1 мл, смесь микроэлементов (1 мг/мл) — 1 мл, CaCl_2 (0.05 M) — 10 мл, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0.05 M) — 10 мл, KCl (0.2 M) — 10 мл, KH_2PO_4 (0.1 M) — 10 мл на 1 л дистиллированной воды. Смесь микроэлементов состоит из $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 28.0 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 8.8 г, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 3.1 г. 100 мг смеси растворяют в 100 мл дистиллированной воды с добавлением 100 мг сульфосалициловой кислоты; pH среды 6.9.

Культуру сапролегниевое гриба-хозяина с грибом-паразитом на этой среде выращивают в чашках Петри при 23—25° при перемежающемся освещении. Для поддержания постоянной температуры чашки накрывали пластиком.

Грибы порядков *Chytridiales* и *Plasmidiophorales*

Двучленные культуры. Метод двучленных культур применяют также для выделения и культивирования хитридиальных грибов пор. *Chytridiales*, паразитирующих на других водных фикомицетах. Двучленные культуры хитридиальных грибов из рода *Rozella*, паразитирующих как на представителях пор. *Blastocladales* из рода *Allomyces*, так и на представителях пор. *Saprolegniales* из рода *Achlya*, были получены с применением основных разработок Шенора (Emerson, 1950, 1958), т. е. в водных культурах на стерильных семенах конопли. Кроме того, пораженную грибом *Rozella allomyces* чистую культуру *Allomyces arbuscula* культивировали в пробирках на среде YpSs (Emerson, 1958). Неоднократно выращивали двучленные культуры хитридиального гриба-паразита *Dictyomorpha dioica*, развивающегося на гифах некоторых видов пор. *Saprolegniales* из родов *Achlya* и *Thraustotheca* (Mullins, 1961; Hidalgo-Quimio, 1965; Mullins, Barksdale, 1965). Процедура получения чистых двучленных культур этих грибов

в основном соответствует описанной Слифкин (Slifkin, 1961, 1962) для получения двучленных культур лагенидиевого гриба *Olpidiopsis* и его хозяина (*Saprolegnia* spp.). Небольшие различия имеются в применявшихся методах очистки. Для очистки культуры хозяина-паразита в случае *D. dioica* используют кольца Ван Тигема по Реперу (Raper, 1937) или же посев инфицированной гифы гриба-хозяина под поверхность агара в чашках Петри с последующим пересевом молодых инфицированных верхушек гиф без бактериального загрязнения (Mullins, 1961; Hidalgo-Quimio, 1965). Двучленные культуры *Achlya*—*D. dioica* выращивают на семенах конопли в стерильной воде (Mullins, 1961; Hidalgo-Quimio, 1965), на среде неопределенного состава F13 (0.75 г мальтозы, 0.02 г мясного пептона, 10.0 г агара на 0.5 л дистиллированной воды) (Mullins, 1961) и на синтетической среде Барксдейл в жидком и твердом вариантах (Barksdale, 1962b; Mullins, Barksdale, 1965). Эта среда по компонентному составу та же, что и для получения двучленной культуры *Saprolegnia*—*Olpidiopsis incrassata* (Slifkin, 1963), но в количественном отношении она несколько модифицирована: в меньших концентрациях входят в ее состав глутамат Na (0.4 г), глюкоза (2.8 г), трис(оксиметил)аминометан (1.2 г), вместо цистина в среду введен метионин и т. д. (Mullins, Barksdale, 1965).

Культуры *Achlya*—*D. dioica* инкубировали в стационарных условиях при 25° как при освещении, так и в темноте. Оптимальный срок инкубации 24 часа.

Кроме сведений о получении двучленных культур паразитных представителей пор. *Chytridiales* и *Lagenidiales*, развивающихся на водных грибах, имеются также данные о получении таких культур гриба *Octomyxa achlyae* (пор. *Plasmidiophorales*), паразитирующего на гифах сапролегниевое гриба из рода *Achlya*. Культуры получают на агаризованной (2%) среде с 0.004% пептона (Couch et al., 1939). Методика, при помощи которой получают двучленные культуры *O. achlyae*—*Achlya*, вполне совпадает с описанными выше.

Метод двучленных культур в последнее время находит все более широкое применение при исследовании водных грибов — облигатных паразитов водорослей. Особенностью этого метода в данном случае является необходимость учета требований, предъявляемых к условиям культивирования автотрофным организмом водоросли-хозяина. Поэтому для получения двучленных культур грибов — облигатных паразитов и водорослей подбирают питательные среды, которые обеспечивают в первую очередь рост организма-хозяина.

Как и в предыдущем случае (получение двучленных культур грибов, паразитирующих на грибах), двучленные культуры гриба-паразита и водоросли-хозяина также часто получают непосредственно в стерильной воде в чашках Петри или часовых стеклах. Из пробы воды, отобранной в исследуемом водоеме, капиллярной

пипеткой изолируют одну микроводоросль с единственным грибным талломом и переносят ее через несколько смен стерильной дистиллированной воды в часовое стекло, наполненное стерильной водой и свежепересейянными клетками водоросли-хозяина из альгологических культур. Последние выращивают на среде с почвенной вытяжкой (Johns, 1964). Часовые стекла с инфицированным материалом инкубируют при комнатной температуре в чашках Петри, которые играют роль влажной камеры (Patterson, 1962; Johns, 1964). Таким образом были получены культуры хитридиальных грибов из родов *Chytridium* и *Polyphagus* на различных зеленых микроводорослях из родов *Eudorina*, *Pandorina*, *Chlamydomonas*, *Volvox*, *Gonium*, *Platydorina*, *Pleodorina*, *Stephanosphaera*, *Botryococcus* и др.

Питательные среды. Наиболее подходящей средой для получения двучленных культур водоросли и гриба-паразита является почвенно-водный экстракт. Воздушно-сухую почву (200 г) в 250 мл дистиллированной воды автоклавируют в течение 15 мин., а затем фильтруют через грубую фильтровальную бумагу на воронке Бюхнера. Полученный фильтрат (250 мл) вновь фильтруют через стерильную почву, а затем опять через фильтровальную бумагу и разводят равным объемом воды. Почвенно-водный экстракт разливают в крупные пробирки (диаметром 25 мм) по 35 мл в каждую и в течение трех недель выращивают на этой среде культуры водорослей при 15—19° и при искусственном освещении. Трехнедельные культуры водорослей инокулируют 1 мл суспензии зооспор гриба-паразита. Инокулированные культуры водорослей в пробирках для получения двучленной культуры водоросли-хозяина и гриба-паразита инкубируют при 24—28° и при искусственном освещении, продолжительность которого 12—16 час. (Barr, Hickman, 1967a, 1967b). Таким способом были получены двучленные культуры хитридиального гриба из рода *Rhizophyidium* на нитчатой водоросли *Spirogyra*.

Среди грибов-фикомицетов, развивающихся на водорослях, а также на водных беспозвоночных, встречаются различные степени перехода от паразитизма к сапрофитизму, и наоборот. Наряду с типичными паразитными грибами имеются и такие, паразитизм которых кажется более или менее случайным и которые нередко развиваются на ослабленных или даже отмерших клетках и нитях водорослей, на таких же экземплярах беспозвоночных. Все эти виды грибов, за исключением облигатных паразитов, могут быть выделены в чистую культуру на питательные среды с помощью методов, разработанных для сапрофитных фикомицетов.

Метод двучленных культур — сложный и трудоемкий, поэтому им пользуются только в том случае, если все попытки выделить гриб-паразит в одноклеточную культуру заканчиваются

неудачей, что свидетельствует о высокой степени специализации гриба по отношению к организму-хозяину и о его облигатном паразитизме.

Грибы сем. *Coelomomycetaceae* (пор. *Blastocladales*)

Фикомицеты, являющиеся облигатными паразитами пресноводных беспозвоночных, известны в нескольких порядках класса, но наиболее компактную и исследованную группу представляют собой виды из пор. *Blastocladales*. Представителей этого семейства, паразитирующих внутриклеточно на различных насекомых, преимущественно на личинках комаров и москитов, выявляют на собранных в различных водоемах экземплярах насекомого-хозяина. Личинки комаров развиваются в изобилии в мелких хорошо прогреваемых лужах в поймах рек; их собирают эмалированным ковшиком, затем пипеткой переносят в сосуды с водой и доставляют в лабораторию. В лаборатории личинок помещают в чашки Петри с минимальным количеством воды и просматривают под микроскопом для выявления грибной инфекции (Umphlett, 1962, 1964). Поражение личинок грибами из рода *Coelomomyces* можно установить и без микроскопирования: инфицированные личинки приобретают желтоватую или краснокоричневую окраску (Couch, 1945b).

Грибы из рода *Coelomomyces*, будучи облигатными паразитами, не поддаются выделению в культуру, поэтому для детальных исследований пораженных этими грибами личинок либо фиксируют 8%-м формалином, либо содержат в воде как живой материал (Umphlett, 1962). На живых личинках микроскопическое исследование грибов производится под малым увеличением (150×), личинку помещают в каплю воды на предметном стекле (без покровного стекла). В лабораторных условиях производят также искусственное заражение личинок покоящимися спорангиями гриба *Coelomomyces*, которые выделяют на предметном стекле из живых инфицированных личинок и хранят в сухом виде на фильтровальной бумаге или в небольших сосудах на глине при комнатной температуре (15—25°). Заражение проводят в специальных бассейнах или ваннах разных размеров при искусственном или естественном освещении в течение 12 час. при температуре воды 25—32° (Umphlett, 1964).

Фиксированный материал (личинки из 8%-го формалина) препарируют на предметном стекле и готовят препарат в лактофеноле с хлопковым синим или с кислым фуксином. Через несколько дней края покровного стекла такого препарата заклеивают. Для цитологических исследований гриба-паразита личинок комаров фиксируют специальными реактивами, обезво-

живают, погружают в парафин и затем делают микротомные срезы, которые окрашивают и закрепляют на предметном стекле (Umphlett, 1962).

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ХРАНЕНИЮ КУЛЬТУР ВОДНЫХ ГРИБОВ

Методы хранения чистых культур водных грибов-сапрофитов весьма разнообразны. При разработке и применении этих методов учитываются особенности морфологии и физиологии водных грибов из разных систематических групп.

Наиболее стандартным является хранение чистых культур водных грибов в пробирках на скошенных агаризованных питательных средах. Однако этот метод не всегда обеспечивает успешное сохранение культур представителей водной микофлоры, которые при длительном выращивании на твердых средах легко вырождаются. Кроме того, он является весьма трудоемким, так как культуры на твердых средах следует пересевать не реже чем один раз в 6 недель (Emerson, 1958). Поэтому для хранения культур водных грибов, в особенности из класса *Phycomycetes*, разработан ряд специфических методов.

Грибы из пор. *Saprolegniales*, *Leptomitales* и *Peronosporales*. Хранят культуры грибов в чашках Петри со стерильной дистиллированной водой на половинках семян конопли или проростках льна, которые предварительно стерилизуют кипячением в течение 5 мин. Длительное (до 1 года и более) хранение этих культур обеспечивается тем, что в чашки Петри или колбы с культурой периодически добавляют свежие приманки и воду, предварительно обработанную древесным углем (Couch, 1927), а кроме того, культуры содержат при пониженных температурах (10°). Одним из факторов, обеспечивающих более длительное хранение сапролегниевых грибов в колбах со стерильной дистиллированной водой, является добавление в эти колбы стерильных листьев дуба, нарезанных мелкими кусочками (Goldie-Smith, 1956). Этот же метод рекомендуется и для хранения культур водных грибов, паразитирующих на представителях пор. *Saprolegniales*.

Методы, предложенные для хранения водных культур сапролегниевых грибов Голди-Смит, были усовершенствованы Джонсоном (Johnson, 1956), который предлагает содержать культуры в литровых сосудах и через каждые 7 месяцев добавлять свежие семена конопли. Позже Дик (Dick, 1965) в значительной степени модифицировал приготовление водных культур сапролегниевых грибов, подлежащих длительному хранению. Из культур сапролегниевых грибов, выращенных в чашках Петри на агаризованной среде Дика с применением колец Ван Тигема по Реперу (Ra-

per, 1937), вырезают блок агара с гифами гриба, лишенными бактериального загрязнения. В конические узкогорлые колбы с 40 мл дважды дистиллированной воды добавляют автоклавированные (в течение 20 мин. при 1.5 атм. в колбах с дважды дистиллированной водой) семена конопли и инокулюм — блок агара с гифами гриба. Ватные пробки колб закрывают сверху плотной стерильной бумагой и заклеивают эластичной лентой (Dick, 1965). Приготовленные таким образом водные культуры сапролегниевых грибов хранят при комнатной температуре без пересевов в течение 15 месяцев, а при 5° — и более длительное время (до 3 лет). Описанный выше метод вполне пригоден также для хранения водных представителей пор. *Leptomitales* (из сем. *Leptomitaceae*) и пор. *Peronosporales* (из сем. *Pythiaceae*) (Dick, 1965). Водная культура *Leptomitus lacteus*, приготовленная по методу Дика, сохранялась при 5° в течение 2 лет.

Дик (Dick, 1968) предлагает также метод приготовления водных культур фикомицетов для пересылки их по почте. Полоса фильтровальной бумаги шириной 15 см сгибается пополам, а затем вчетверо и скатывается в рулончик, так что два сухих семени оказываются внутри этого рулона. Затем свернутую бумагу погружают в специальную пробирку так, чтобы часть бумаги, прикрывающая семена, была на 5 см ниже отверстия пробирки. Пробирку неплотно закрывают металлической крышкой, а затем автоклавировать. После того, как пробирка остынет, инокулюм в виде блока агара с мицелием гриба или в виде культуры гриба на семенах конопли помещают на фильтровальную бумагу, находящуюся на дне пробирки, т. е. с противоположной стороны от того места, где расположены семена, плотно закручивают крышку и инкубируют в течение 12 час., чтобы убедиться, что гриб заселил семена конопли до отправки по почте.

Грибы из пор. *Blastocladiiales* (роды *Allomyces* и *Catenaria*) и пор. *Peronosporales* (сем. *Pythiaceae*). Для хранения водных грибов из пор. *Blastocladiiales* предлагается постепенно высушивать их водные культуры в чашках Петри или на листах фильтровальной бумаги. Подсушенные таким образом культуры бластокладиевых грибов (роды *Allomyces* и *Catenaria*) вместе с семенами конопли, на которых они развивались, сохраняются в проэтикетированных конвертах на протяжении ряда лет, не теряя при этом жизнеспособности. Некоторые виды рода *Allomyces* оставались жизнеспособными через 14—17 лет хранения описанным способом. Подобным образом сохраняют сухие культуры видов рода *Blastocladiella*, которые в водной культуре выращивают на кусочках листьев *Paspalum*. Вполне пригодным оказался этот способ и для хранения культур некоторых сапрофитных видов питиевых грибов (пор. *Peronosporales*), выращенных в водных культурах на семенах конопли. Вместе с грибом-хозяином из рода *Allomyces* в сухой культуре сохранялся, не утрачивая жизне-

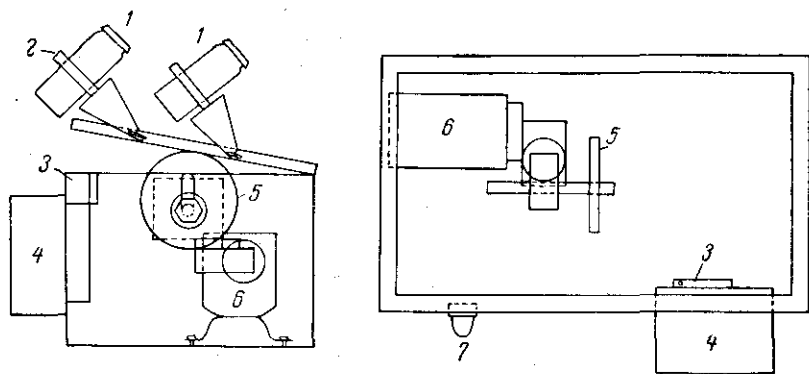


Рис. 14. Аппарат для содержания культур водных фикомицетов при постоянном увлажнении.

1 — бутылки; 2 — держатель Терри; 3 — микропереключатель; 4 — хронометр; 5 — кулачок вала; 6 — мотор с приводом (зубчатый передаточный механизм); 7 — индикаторная лампочка. Справа — вид сверху, слева — вид сбоку.

способности, паразитный фикомицет из рода *Rozella* (Goldie-Smith, 1956). При подборе методов хранения водных грибов-фикомицетов необходимо строго соблюдать требования индивидуального подхода не только к отдельным группам, но и к отдельным видам грибов. Методы хранения водных культур фикомицетов, хотя и оказываются полезными при хранении ряда видов грибов, далеко не всегда обеспечивают сохранение чистоты культуры.

Грибы из порядков *Chytridiales* и *Blastocladales*. В настоящее время хранение культур водных фикомицетов из этих порядков осуществляется на скошенном агаре YpSs, поверхность которого периодически смачивается стерильной водой, что стимулирует образование зооспор и распространение гриба по всей поверхности среды. Для этой цели сконструирован специальный аппарат (рис. 14), состоящий из медленно колеблющейся платформы, которую приводит в движение мотор. Мотор работает с интервалами, продолжительность которых определяется синхронными часами. Через посредство соответствующего кулачка вала мотор то поднимает, то опускает платформу, на которой закреплены два штатива с вставленными в них пружинными обоймами. В каждой такой обойме зажат широкогорлый сосуд, содержащий скошенную питательную среду YpSs, кусочек гриба-инокулюма и 2 мл стерильной воды. Когда платформа поднимается, стерильная вода в сосудах прокатывается по всей поверхности скошенного агара; когда же она не движется, т. е. находится в горизонтальном положении, вода занимает дно сосуда. Таким образом и осуществляется периодическое смачивание культуры с интервалами, которые определяет исследователь, устанавливая

соответствующим образом синхронные часы. С помощью этого аппарата в течение трех лет сохраняли чистые культуры *Rhizophlyctis rosea*, *Chytridium olla*, *Blastocladiella emersonii* и некоторых других водных грибов (Webster, 1965a).

Хранение водных фикомицетов из разных порядков (*Saprolegniales*, *Blastocladales*, *Leptomitales*, *Chytridiales* и др.) на стандартных агаризованных средах под слоем минерального масла. Гораздо удобнее хранение культур водных грибов в пробирках на стандартных агаризованных питательных средах (YpSs, агар с кукурузной мукой, глюкозо-дрожжевая среда и др.). В настоящее время таким образом сохраняют культуры сапрофитных водных грибов из многих порядков класса *Phycomycetes* (Emerson, 1958, 1964). Так хранят и чистые культуры водных гифомицетов, которые выращивают в пробирках с мальц-агаром или с агаром с овсяной мукой, и культуры грибов из сточных и загрязненных вод. Наибольшие трудности встречаются при хранении на твердых средах культур водных фикомицетов, которые при таких условиях хранения легко вырождаются.

Хранение культур под слоем минерального масла позволяет избежать вырождения и намного продлевает сроки хранения без утраты жизнеспособности. Этот метод заключается в том, что культуры грибов в пробирках на косяках питательной агаровой среды заливают стерильным минеральным маслом с большой вязкостью и удельным весом 0.8—0.9. Уровень масла должен быть не более 1 см над верхним краем скошенного агара.

Среди водных фикомицетов метод хранения под слоем минерального масла хорошо разработан для культур грибов из пор. *Saprolegniales* (Buell, Weston, 1947; Reischer, 1949; Goldie-Smith, 1956; Seymour, 1970). Сапролегниевые грибы, выращенные в пробирках на агаре с кукурузной мукой, картофельно-декстрозном агаре, агаре с ржаной мукой и мальтозо-пептонном агаре и залитые минеральным маслом, хранятся в помещении при 10°. Срок хранения чистых культур сапролегниевых грибов с помощью этого метода — несколько месяцев (Reischer, 1949), максимально — до 5 лет (Fennell, 1960). Этот метод хранения чистых культур, по-видимому, приемлем не только для представителей пор. *Saprolegniales*, но также порядков *Blastocladales*, *Leptomitales* и других фикомицетов. Имеются сведения о том, что культура гриба *Rhizophlyctis rosea* (пор. *Chytridiales*) сохранялась под слоем минерального масла при 5° в течение 12 месяцев (Haskins, Weston, 1950), а культура одного вида из рода *Rhizidiomyces* (пор. *Hyphochytriales*) — в течение 19 месяцев (Fennell, 1960). Неудачи, которые иногда имеют место при хранении культур водных фикомицетов под слоем минерального масла, в большинстве случаев объясняются несоответствием питательной среды для данного вида или бактериальным загрязнением сохраняемых культур (Fennell, 1960). Иногда вместо минерального масла рекомендуется парафин (Unestam, 1965).

Метод хранения культур под слоем минерального масла наряду с преимуществами (сокращение числа пересевов, неблагоприятные условия для развития в культуре гриба случайно занесенных насекомых) имеет и определенные недостатки: 1) пробирки с культурами должны храниться только в вертикальном положении; 2) культуры грибов, сохраняемые с помощью этого метода, довольно легко загрязняются бактериями; 3) эти культуры недоступны для немедленного просмотра. Поэтому продолжают поиски наиболее оптимальных методов хранения культур водных фикомицетов.

Попытка применить для хранения культур водных фикомицетов метод лиофилизации пока не дала положительных результатов (Fennell et al., 1950; Fennell, 1960).

Примечание. В настоящей книге реферированы методические исследования по водным грибам, опубликованные в отечественных и зарубежных микологических журналах, сборниках и т. д. за последние три десятилетия. Некоторые роды грибов, из числа упомянутых в этих работах, ныне отнесены к синонимам или их систематическое положение пока остается недостаточно определенным: *Monotosporella* Hughes (= *Brachysporiella* Bat.), *Dactylaria* Sacc.? (= *Dactylium* Nees ex Fr.), *Arenariomyces* Höhnk. (= *Corollospora* Werderm.), *Peritrichospora* Linder (= *Corollospora* Werderm.), *Stigmatea* Fr. (= *Stigmaea* Fr.), *Phaeosphaeria* Miyake? (= *Trematosphaerella* Kirscht.), *Nia* Moore et Meyers (*Basidiomycetes*?), *Dendryphiella* Bubak et Ranojevic? (= *Dendryphon* Wallr.), *Hydronectria* Kirscht.? (= *Nectriella* Nits.), *Hormodendrum* Bon. или *Hormodendron* Bon. (= *Cladosporium* I.k. ex Fr.), *Karlingia* A. E. Johanson (= *Rhizophlyctis* A. Fischer), *Pachybasium* Sacc. (= *Trichoderma* Pers. ex Fr.).

Литература к главе I

- Арнольд Г. Р. В. Методы сбора и изучения пресноводных гифомицетов. Микол. и фитопатол., 1968, 2 : 158—160.
- Бауер О. Н., Мусселиус В. А., Стрелков Ю. А. Болезни прудовых рыб. Изд. «Колос», М., 1969.
- Беккер З. Э. Физиология грибов и их практическое использование. Изд. МГУ, 1963.
- Беспалый И. И. Жаберная гниль карпа и меры борьбы с ней. Изд. АН УССР, Киев, 1950.
- Горегляд Х. С. Болезни и вредители рыб. Сельхозгиз, М., 1955.
- Догадина Т. В., Логвиненко Л. И., Стеблюк М. И. К изучению санитарно-биологического режима очистных сооружений. Гидробиол. журн., 1970, 6 : 81—85.
- Дудка І. О. Огляд методів дослідження водних грибів. Укр. бот. журн., 1961, 18 : 45—55.
- Дудка И. А. Первая находка рода *Blastocladi* в СССР. Бот. матер. Отд. спор. раст., 1963, 16 : 83—87.
- Дудка І. О. До екології та сезонної динаміки водних гіфоміцетів південної частини Київського Полісся. Укр. бот. журн., 1964, 21 : 50—57.
- Дудка И. А. Водные грибы южной части Киевского Полесья. Автореф. канд. дисс. Киев, 1965.
- Дудка І. О. До питання про склад мікофлори забруднених водойм в околицях м. Києва. Укр. бот. журн., 1966, 23 : 71—74.
- Дудка И. А. О методах количественного учета водных гифомицетов. Матер. III Закавказск. конфер. по спорным растениям. Тбилиси, 1968 : 88—92.
- Дудка И. А. К оценке численности конидий водных гифомицетов в реках и ручьях Терского берега Кольского полуострова. Гидробиол. журн., 1971, 7 : 23—27.
- Дудка І. О. Водні гіфоміцети України. Изд. «Наукова думка», Київ, 1974.
- Жадин В. И. Методы гидробиологического исследования. Изд. «Высшая школа», М., 1960.
- Иерусалимский Н. Д. Азотное и витаминное питание микробов. Изд. АН СССР, М., 1949.
- Иерусалимский Н. Д. Основы физиологии микробов. Изд. АН СССР, М., 1963.
- Инголд Ц. Пути и способы распространения грибов. ИЛ, М., 1957.
- Каныгина А. В. О скорости развития обростаний сапробных организмов. Микробиология, 1935, 4 : 205—224.
- Рокотия Т. Г. Бентос Невской губы. Сб. Ленинградского инженерно-строительного инст. «Санитарное состояние Невской губы», 1963, 46 : 95—110.

- Кокколия Т. Г. О развитии водного гриба лептомитуса и других компонентов биологических обрастаний в р. Неве. Сб. Ленинградского инженерно-строительного инст. «Санитарное состояние р. Невы», 1967а, 50 : 110—126.
- Кокколия Т. Г. О развитии водного гриба лептомитуса и других компонентов биологических обрастаний в р. Неве. Тез. докл. Всесоюз. п.-т. конфер. по охране поверхн. и подземн. вод от загрязнений, М., 1967б : 59—61.
- Кокколия Т. Г. Лабораторные исследования условий питания гриба *Leptomitius lacteus* (Roth.) Ag., препятствующего эксплуатации сооружений ленинградского водопровода. В кн.: Краткие содерж. докл. XXVI научн. конфер. Ленинградск. инж.-строит. инст., 1968а : 41—44.
- Кокколия Т. Г. Влияние некоторых факторов среды на развитие *Leptomitius lacteus* (Roth.) Ag. Микол. и фитопатол., 1968б, 2 : 193—198.
- Кокколия Т. Г. Изучение водного гриба *Leptomitius lacteus* (Roth.) Ag. в связи с загрязнением реки Невы. Автореф. канд. дисс. Л., 1969.
- Кокколия Т. Г., Л. И. Волгина. Микробиологическая характеристика р. Невы. Сб. Ленинградск. инж.-строит. инст. «Санитарное состояние р. Невы», 1967 : 145—154.
- Лилли В., Барнетт Г. Физиология грибов. ИЛ, М., 1953.
- Литвинов М. А. Материалы к изучению хитридиевых грибов пресных вод Латвии. Тр. Бот. инст. АН СССР, 1953, 8 : 73—84.
- Литвинов М. А. Методы изучения почвенных микроскопических грибов. Изд. «Наука», Л., 1969.
- Логвиненко Л. И. Фикомицеты в стічних водах Безлюдівських очисних споруд. Мікробіол. журн., 1970, 32 : 317—322.
- Методы экспериментальной микологии. Под ред. чл.-корр. АН УССР В. И. Билый. Изд. «Наукова думка», Киев, 1973.
- Мещерякова Р. И. Види роду *Pythium* з очисних споруд. Мікробіол. журн., 1970, 32 : 215—219.
- Мещерякова Р. И., Логвиненко Л. И. Морфолого-систематические исследования грибов сточных вод. В кн.: Биологическая наука в университетах и пединститутах Украины за 50 лет. Изд. Харьковск. унив., 1968 : 29—32.
- Міловцова М. О. Водні гриби Харків та його околиць. Тр. Н.-д. ін-ту ботаніки при Харківськ. держ. унів., 1936, 1 : 28—36.
- Михалюк И. А. Коли-индекс и грибная микрофлора в водах с различной степенью загрязнения. Микробиология, 1958, 27 : 724—726.
- Павлинова Р. М. Обследование Балахнинской картонной фабрики в связи с развитием грибных обрастаний. Бумажн. пром., 1933, 10 : 51—56.
- Павлинова Р. М. Обследование биологических обрастаний на Балахнинском бумажном комбинате. Бумажн. пром., 1935, 5 : 52—64.
- Павлинова Р. М. Влияние сточных вод целлюлозно-бумажной промышленности на рыбопромысловые водоемы и разработка норм их сброса. Изв. Всесоюз. н.-и. инст. озера и речн. рыбн. хозяйства, 1952, 31 : 82—141.
- Разумов А. С. О водном грибе *Nematosporangium nikitinskii* (n. sp.). Микробиология, 1935, 4 : 461—487.
- Разумов А. С. Биологические обрастания в системе питьевого и технического водоснабжения и меры борьбы с ними. Информ. матер. ВОДГЕО, 2, М., 1953.
- Раскина Е. Е. Биологические помехи в работе Ленинградского водопровода. Тр. Гидробиол. об-ва, 1963, 14 : 137—150.
- Agnihotri V. P. Production and germination of appressoria in *Pythium irregulare*. Mycol., 1969, 61 : 967—980.
- Ajello L. A cytological and nutritional study of *Polychytrium aggregatum*. I. Cytology. Amer. J. Bot., 1948a, 35 : 1—12.
- Ajello L. A cytological and nutritional study of *Polychytrium aggregatum*. II. Nutrition. Amer. J. Bot., 1948b, 35 : 135—141.
- Alasoadura S. O. *Flabelliospora crassa* n. gen., n. sp., an aquatic hyphomycete from Nigeria. Nova Hedwigia, 1968a, 15, 2—4 : 415—418.
- Alasoadura S. O. Some aquatic hyphomycetes from Nigeria. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1968b, 51 : 535—540.
- Al-Hassan K. K., Fergus C. L. The influence of oils and sterols on sexual reproduction of species of *Pythium*. Mycol., 1968, 60 : 1243—1246.
- Al-Hassan K. K., Fergus C. L. Oospore production of *Pythium artotrogus*. Mycopathol. et mycol. appl., 1969, 39 : 273—286.
- Anastasiou C. J. Some aquatic *Fungi imperfecti* from Hawaii. Pacif. Sci., 1964, 18 : 202—206.
- Antikajian G. A developmental, morphological and cytological study of *Asterophlyctis* with special reference to its sexuality, taxonomy and relationships. Amer. J. Bot., 1949, 36 : 245—262.
- Archer J. F., Willoughby L. G. Wood as the growth substratum for a freshwater foam spore. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1969, 53 : 484—486.
- Bakerspiegel A. Nuclear structure and division in the vegetative mycelium of the *Saprolegniaceae*. Amer. J. Bot., 1960, 47 : 94—100.
- Barksdale A. W. Inter-tallic sexual reactions in *Achlya*, a genus of the aquatic fungi. Amer. J. Bot., 1960, 47 : 14—23.
- Barksdale A. W. Concerning the species *Achlya bisexualis*. Mycol., 1962a, 54 : 704—712.
- Barksdale A. W. Effect of nutritional deficiency of growth and sexual reproduction of *Achlya ambisexualis*. Amer. J. Bot., 1962b, 49 : 633—638.
- Barksdale A. W. The uptake of exogenous hormone A by certain strains of *Achlya*. Mycol., 1963a, 55 : 164—171.
- Barksdale A. W. The role of hormone A during sexual conjugation in *Achlya ambisexualis*. Mycol., 1963b, 55 : 627—632.
- Barksdale A. W. *Achlya ambisexualis* and a new crossconjugating species of *Achlya*. Mycol., 1965, 57 : 493—501.
- Barksdale A. W. Segregation of sex in the progeny of a selfed heterozygote of *Achlya bisexualis*. Mycol., 1966, 59 : 802—804.
- Barksdale A. W. Nutrition and antheridial-induced branching in *Achlya ambisexualis*. Mycol., 1970, 62 : 411—420.
- Barnes H. D., Cantino E. C. Nutritional relationships of a new species of *Blastocladiella*. Amer. J. Bot., 1952, 39 : 746—751.
- Barr D. J. S. *Hyphochytrium catenoides*: a morphological and physiological study of North American isolates. Mycol., 1970a, 62 : 492—503.
- Barr D. J. S. Two varieties of *Rhizophyidium sphaerocarpum* (Chytridiales). Canad. J. Bot., 1970b, 48 : 1067—1071.
- Barr D. J. S., Hickman C. J. Chytrids and algae. I. Host-substrate range and morphological variation of species of *Rhizophyidium*. Canad. J. Bot., 1967a, 45 : 423—430.
- Barr D. J. S., Hickman C. J. Chytrids and algae. II. Factors influencing parasitism of *Rhizophyidium sphaerocarpum* on *Spirogyra*. Canad. J. Bot., 1967b, 45 : 431—440.
- Bary A. de. Untersuchungen über die Peronosporaceen und Saprolegnieen und die Grundlagen eines natürlichen System der Pilze. IV. Beitr. Morphol. u. Physiol. d. Pilze, 1881, 4 : 1—145.
- Becker J. G., Shaw C. G. Fungi in domestic sewage treatment plants. Appl. Microbiol., 1955, 3 : 173—180.
- Berdan H. Two new genera of operculate chytrids. Amer. J. Bot., 1939, 26 : 459—463.
- Berdan H. A developmental study of there saprophytic chytrids. I. *Cladochytrium hyalinum* sp. nov. Amer. J. Bot., 1941, 28 : 422—438.
- Bernstein L. B. A biosystematic study of *Rhizophlyctis rosea* with emphasis on zoospore variability. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1968, 84 : 84—93.

- Bhargava K. S. Physiological studies on some members of the family Saprolegniaceae. II. Sulphur and phosphorus requirements. Proc. Indian Acad. Sci., sect. B, 1945a, 21 : 344—349.
- Bhargava K. S. Physiological studies on some members of the family Saprolegniaceae. III. Nitrogen requirements. J. Indian Bot. Sci., 1945b, 24 : 67—72.
- Bhargava K. S. Oogenesis and fertilization in *Isoachlya anisospora* var. *indica*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1946, 29 : 101—107.
- Biesbrock J. A., Hendrix F. F., Jr. A taxonomic study of *Pythium irregulare* and related species. Mycol., 1967, 59 : 943—952.
- Bishop H. A study of sexuality in *Sapromyces reinschii*. Mycol., 1940, 32 : 505—529.
- Blackwell E. M. Germination of the resistant spores of *Blastocladiella pringsheimii*. Nature, 1937, 140 : 933.
- Blackwell E. M. The life cycle of *Blastocladiella pringsheimii* Reinsch. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1940, 24 : 68—86.
- Blank J. H., Tiffney W. H. The use of ultraviolet irradiated culture media for securing bacteria — free culture of *Saprolegnia*. Mycol., 1936, 28 : 324—329.
- Bostick L. R. Studies of the morphology of *Chytrium hyalinus*. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1968, 84 : 94—99.
- Brown D. H., Cantino E. C. The oxidation of malate by *Blastocladiella emersonii*. Amer. J. Bot., 1955, 42 : 337—342.
- Buell C. B., Weston W. H. Application of the mineral oil conservation method to fungous cultures. Amer. J. Bot., 1947, 34 : 555—561.
- Butcher R. W. Ecology of sewage fungus. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1932, 17 : 112—114.
- Canter H. M. On an unusual fungoid organism, *Sphaerita dinobryoni* n. sp., living in species of Dinobryon. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1968a, 84 : 56—61.
- Canter H. M. Studies on British chytrids. XXVII. *Rhizophyidium fugax* sp. nov., a parasite of planctonic cryptomonads with additional notes and records of planctonic fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1968b, 51 : 699—705.
- Canter H. M. Studies on British chytrids. XXVIII. *Rhizophyidium nobile* sp. nov., parasitic on the resting spore of Ceratium hirudinella O. F. Müll. from the plankton. Proc. Linnean Soc. London, 1968c, 179 : 197—201.
- Canter H. M. Studies on British chytrids. XXIX. A taxonomic revision of certain fungi found on the diatoms Asterionella. Bot. J. Linnean Soc., 1969, 62 : 267—278.
- Canter H. M. Studies on British chytrids. XXX. On *Podochytrium cornutum* Sparrow. Bot. J. Linnean Soc., 1970, 63 : 47—52.
- Canter H. M., Lund J. W. G. Studies on plankton parasites. I. Fluctuation in the numbers of Asterionella formosa Hass. in relation to fungal epidemics. New Phytologist, 1948, 47 : 238—261.
- Canter H. M., Lund J. W. G. Studies on plankton parasites. III. Examples of the interaction between parasitism and other factors determining the growth of diatoms. Ann. Bot., N. S., 1951, 15 : 359—371.
- Canter H. M., Lund J. W. G. Studies on plankton parasites. II. The parasitism of diatoms with special reference to lakes in the English Lake district. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1953, 36 : 13—37.
- Cantino E. C. The vitamin nutrition of an isolate of *Blastocladiella pringsheimii*. Amer. J. Bot., 1948, 35 : 238—243.
- Cantino E. C. The physiology of the aquatic *Phycomycetes*, *Blastocladiella pringsheimii*, with emphasis on its nutrition and metabolism. Amer. J. Bot., 1949, 36 : 95—113.
- Cantino E. C. Metabolism and morphogenesis a new *Blastocladiella*. Ant. v. Leeuwenhoek. J. Microbiol. and Serol., 1951, 17 : 325—362.
- Cantino E. C. The relation between cellular metabolism and morphogenesis in *Blastocladiella*. Mycol., 1956, 48 : 225—240.
- Cantino E. C. Physiological age and germinability of resistant sporangia of *Blastocladiella emersonii*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1969, 53 : 463—467.
- Cantino E. C., Hyatt M. T. Carotenoids and oxidative enzymes in the aquatic *Phycomycetes*, *Blastocladiella* and *Rhizophlyctis*. Amer. J. Bot., 1953, 40 : 688—693.
- Cantino E. C., Lovett J., Horenstein E. A. Chitin synthesis and nitrogen metabolism during differentiation in *Blastocladiella emersonii*. Amer. J. Bot., 1957, 44 : 498—505.
- Cejp K. První příspěvek k poznání českých Saprolegnií. Mykologia, 1931, 8 : 95—100.
- Cejp K. *Achlya racemosa* (příspěvky k morfologii, biologii a kulturám vodních plisní). Věda přírodní, 1932a, 13 : 12—15.
- Cejp K. *Rhipidium americanum* Thaxter a *Apodachlya pyrifera* Zopf v Československu. Rozpr. České akad. věd. umění, tř. II, mat.-přir., 1932b, 42 : 1—11.
- Cejp K. Nové nálezy Saprolegniaceí v Čech. Rozpr. České akad. věd. umění, tř. II, mat.-přir., 1934, 44 : 1—12.
- Cejp K. Monografická studie řádu *Blastocladales* (*Phycomycetes*). Věst. Královské české společ. nauk., tř. mat.-přir., 1947, 17 : 1—55.
- Cejp K. Flora ČSR. *Oomycetes*. I. České akad. věd., Praha, 1959.
- Coker W. C. The *Saprolegniaceae*, with notes on other water molds. Univ. North Carolina Press, 1923.
- Coker W. C., Leitner J. New species of *Achlya* and *Apodachlya*. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1938, 54 : 311—318.
- Conway K. E. The aquatic *Hyphomycetes* of central New York. Mycol., 1970, 62 : 516—530.
- Cooke W. B. Fungi in polluted water and sewage. I. Literature review. Sewage and Industr. Wastes, 1954a, 26 : 539—549.
- Cooke W. B. Fungi in polluted water and sewage. II. Isolation technique. Sewage and Industr. Wastes, 1954b, 26 : 661—674.
- Cooke W. B. Fungi in polluted water and sewage. III. Fungi in small polluted stream. Sewage and Industr. Wastes, 1954c, 26 : 790—794.
- Cooke W. B. The use of antibiotics in media for the isolation of fungi from polluted water. Antibiot. and Chemotherapy, 1954d, 4 : 657—662.
- Cooke W. B. Potential plant pathogenic fungi in sewage and polluted water. Plant Disease Report, 1956, 40 : 681—687.
- Cooke W. B. Check list of fungi isolated from polluted water and sewage. Sydowia, 1957, 2 : 146—175.
- Cooke W. B. Pollution effects on the fungous population of a stream. Ecology, 1961, 42 : 1—18.
- Cooke W. B. Species of *Fusarium* isolated from a waste stabilization pond system. Mycopathol. et mycol. appl., 1962, 18 : 225—233.
- Cooke W. B. A laboratory guide to fungi in polluted waters, sewage and sewage treatment system. U. S. Dpt Health, Education, Welfare, 1963.
- Cooke W. B. Some fungi in the Cache La Poudre river, Colorado. Mycopathol. et mycol. appl., 1968, 35 : 361—372.
- Cooke W. B., Bartsch A. F. Aquatic fungi in polluted water. Sewage and Industr. Wastes, 1959, 31 : 1316—1322.
- Cooke W. B., Bartsch A. F. Aquatic fungi in some Ohio streams. Ohio J. Sci., 1960, 60 : 144—148.
- Cooke W. B., Kabler P. Isolation of potentially pathogenic fungi from polluted water and sewage. Publ. Health Rep., Washington, 1955, 70 : 689—694.
- Cooke W. B., Matsuura G. S. Distribution of fungi in a waste stabilization pond system. Ecology, 1969, 50 : 689—694.
- Cornu M. Monographie des Saprolegniées: étude physiologique et systématique. Ann. sci. natur., Paris, ser. 5, 1872, 15 : 1—198.
- Couch J. N. Some new water fungi from the soil with observation on spore formation. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1927, 42 : 227—242.

- Couch J. N. Technic for collection, isolation and culture of chytrids. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1939, 55 : 208—214.
- Couch J. N. Observations on the genus *Catenaria*. Mycol., 1945a, 37 : 163—193.
- Couch J. N. Revision of the genus *Coelomomyces*, parasitic in insect larvae. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1945b, 61 : 124—136.
- Couch J. N., Leitner J., Whiffen A. J. A new genus of the *Plasmodiophoraceae*. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1939, 55 : 399—408.
- Couch J. N., Whiffen A. J. Observations on the genus *Blastocladiella*. Amer. J. Bot., 1942, 29 : 582—591.
- Cox H. T. A new genus of *Rhizidiaceae*. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1939, 55 : 389—397.
- Crane J. L. Freshwater *Hyphomycetes* of the Northern Appalachian Highland including New England and three coastal plain states. Amer. J. Bot., 1968, 55 : 996—1002.
- Crasemann J. M. The nutrition of *Chytridium* and *Macrochytrium*. Amer. J. Bot., 1954, 41 : 302—310.
- Crasemann J. M. Comparative nutrition of two species of *Blastocladiella*. Amer. J. Bot., 1957, 44 : 218—224.
- Dayal R. Utilization of oligo- and polysaccharides. Proc. Nat. Inst. Sci. India, Biol. Sci., 1961, 27 : 83—90.
- Dayal R., Tandon R. N. Ecological studies of some aquatic *Phycomycetes*. Hydrobiol., 1962, 20 : 121—127.
- Dayal R., Tandon R. N. Ecological studies of some aquatic *Phycomycetes*. II. Fungi in relation to chemical factors of the water. Hydrobiol., 1963, 22 : 324—330.
- Dayal R., Thakur J. The occurrence and distribution of aquatic fungi in certain ponds of Varanasi. Hydrobiol., 1966, 27 : 548—558.
- Dayal R., Thakur J. Studies on aquatic fungi of Varanasi. III. Observations on some parasitic aquatic *Phycomycetes*. Sydowia, 1968 (1969), 22 : 278—283.
- Dayal R., Thakur J. Studies on aquatic fungi of Varanasi. II. A new species of *Achlya* with notes on other species. Mycopathol. et mycol. appl., 1969, 38 : 169—174.
- Dick M. W. A critical study of the taxonomy of the *Achlya spinosa*, *A. stellata*, *A. cornuta* complex. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1960, 43 : 479—488.
- Dick M. W. *Apodachlyella completa* (Humphrey) Indoh. J. Linnean Soc. London (Bot.), 1964, 59 : 57—62.
- Dick M. W. The maintenance of stock culture of *Saprolegniaceae*. Mycol., 1965, 57 : 828—831.
- Dick M. W. A method of preparing cultures of aquatic phycomycetes suitable for mailing. Biol. sol (Paris), 1968, 9 : 18—19.
- Dick M. W., Newby H. V. The occurrence and distribution of *Saprolegniaceae* in certain soils of south-east England. I. Occurrence. J. Ecol., 1961, 49 : 403—419.
- Dogma I. J., Jr. Observations on some cellulosic chytridiaceous fungi. Arch. Microbiol., 1969, 66 : 203—219.
- Dogma I. J., Jr., Sparrow F. K. A hyperparasitic *Blyttomyces*. Mycol., 1969, 61 : 1149—1158.
- Doguet G. *Digitatispora marina* n. g., n. sp., Basidiomycete marine. C. R. Acad. Sci. Paris, 1962a, 254 : 4336—4338.
- Doguet G. Recherches sur les noyaux des basides du *Digitatispora marina*. Bull. Soc. mycol. France, 1962b, 78 : 283—290.
- Domnas A. Refractory response of *Blastocladiella emersonii* to bicarbonate. Mycol., 1968, 60 : 698—701.
- Elliott R. F. Effects of kinetin and related compounds on growth and sexual reproduction of *Saprolegnia australis*. Planta, 1967, 77 : 164—175.
- Emerson R. An experimental study of the life cycle and taxonomy of *Allomyces*. Lloydia, 1941, 4 : 77—144.
- Emerson R. Current trends of experimental research on the aquatic *Phycomycetes*. Ann. Rev. Microbiol., 1950, 4 : 169—200.
- Emerson R. Mycological organization. Mycol., 1958, 50 : 589—621.
- Emerson R. Performing fungi. Amer. Biol. Teacher, 1964, 26 : 90—100.
- Emerson R., Cantino E. C. The isolation, growth and metabolism of *Blastocladiella* in pure culture. Amer. J. Bot., 1948, 35 : 157—171.
- Emerson R., Held A. A. *Aqualinderella fermentans* gen. et sp. n., a phycomycete adapted to stagnant waters. II. Isolation, cultural characteristics and gas relations. Amer. J. Bot., 1969, 56 : 1103—1120.
- Emerson R., Weston W. H. *Aqualinderella fermentans* gen. et sp. nov., a phycomycete adapted to stagnant waters. I. Morphology and occurrence in nature. Amer. J. Bot., 1967, 54 : 702—719.
- Emerson R., Wilson C. M. Interspecific hybrids and the cytogenetic and cytotaxonomy of *Euallomyces*. Mycol., 1954, 46 : 393—434.
- Fennell D. J. Conservation of fungous cultures. Bot. Rev., 1960, 26 : 79—141.
- Fennell D. J., Raper K. B., Fliken M. H. Further investigation on the preservation of mold cultures. Mycol., 1950, 42 : 135—146.
- Foley J. M. The occurrence, characteristics and genetic behavior of albino-gametophyte in *Allomyces*. Amer. J. Bot., 1958, 45 : 639—647.
- Fries N. Effects of different purine compounds on the growth of guanine-deficient *Ophiostoma*. Physiol. Plant., 1949, 2 : 78—102.
- Fuller M. S. Growth and development of the water mold *Rhizidiomyces* in pure culture. Amer. J. Bot., 1962, 49 : 64—71.
- Fuller M. S., Barshad I. Chitin and cellulose of the cell walls of *Rhizidiomyces* sp. Amer. J. Bot., 1960, 47 : 105—109.
- Fuller M. S., Poytton R. O. A new technique for the isolation of aquatic fungi. Bioscience, 1964, 14 : 45—46.
- Gilpin R. H. Concerning the nutrition of *Apodachlya brachynema*. Mycol., 1954, 46 : 702—707.
- Gleason F. H. Respiratory electron transport systems of aquatic fungi. I. *Leptomitilacteus* and *Apodachlya punctata*. Plant Physiol., 1968a, 43 : 597—605.
- Gleason F. H. Nutritional comparisons in *Leptomitales*. Amer. J. Bot., 1968b, 55 : 1003—1010.
- Gleason F. H., Price J. S. Lactic acid fermentation in lower fungi. Mycol., 1969, 61 : 945—957.
- Gleason F. H., Unestam T. Cytochromes of aquatic fungi. J. Bacteriol., 1968a, 95 : 1599—1603.
- Gleason F. H., Unestam T. Comparative physiology of respiration in aquatic fungi. I. The *Leptomitales*. Physiol. Plant., 1968b, 21 : 556—572.
- Goldie-Smith E. K. Note on a method of inducing sporangium formation in *Pythium undulatum* Petersen and in species of *Saprolegnia*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1950, 33 : 92—93.
- Goldie-Smith E. K. Maintenance of stock culture of aquatic fungi. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1956, 72 : 158—166.
- Goldstein S. Factors affecting the growth and pigmentation of *Cladochytrium replicatum*. Mycol., 1960a, 52 : 490—498.
- Goldstein S. Physiology of aquatic fungi. I. Nutrition of two monocentric chytrids. J. Bacteriol., 1960b, 80 : 701—707.
- Goldstein S. Studies of two polycentric chytrids in pure culture. Amer. J. Bot., 1961, 48 : 294—298.
- Golueke C. G. Comparative studies of the physiology of *Sapromyces* and related genera. J. Bacteriol., 1957, 74 : 337—343.
- Greathhead S. K. Some aquatic *Hyphomycetes* in South Africa. J. South Afr. Bot., 1961, 27 : 195—228.
- Greenwood A. D. Some physiological aspects of asexual reproduction in the *Saprolegniales*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1955, 38 : 170.

- Griffin D. H. The interaction of hydrogen ion, carbon dioxide and potassium ion in controlling of formation of resistant sporangia in *Blastocladiella emersonii*. J. Gen. Microbiol., 1965, 40 : 13—28.
- Hanuška L. Biologické metody skúmania a hodnotenia vôd. Bratislava, 1956.
- Hanuška L. Huby (Fungi, Mycophyta) v samočistiacom procese vody. Biologia, 1967, 22 : 938—945.
- Hanuška L. Die Pilze — indikatoren der Saprobität. Acta mycol., 1968, 4 : 411—421.
- Harvey J. V. A study of water molds and pythiums occurring in the soils of Chapel Hill. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1925, 41 : 151—164.
- Harvey J. V. Relationship of aquatic fungi to water pollution. Sewage and Industr. Wastes, 1952, 24 : 1159—1164.
- Haskins R. H. Cellulose as a substratum for saprophytic chytrids. Amer. J. Bot., 1939, 26 : 635—639.
- Haskins R. H. New chytridiaceous fungi from Cambridge. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1946, 29 : 135—140.
- Haskins R. H., Weston W. H., Jr. Studies in the lower Chytridiales. I. Factors affecting pigmentation, growth and metabolism of a strain of *Karlingia (Rhizophlyctis) rosea*. Amer. J. Bot., 1950, 37 : 739—750.
- Hawkes H. A. Factors influencing the seasonal incidence of fungal growth in sewage bacteria beds. Air and Water Pollution, 1965, 9 : 693—714.
- Held A. A. Nutrition and fermentative energy metabolism of the water mold *Aqualinderella fermentans*. Mycol., 1970, 62 : 339—358.
- Held A. A., Emerson R. Oogonium production in *Aqualinderella fermentans*. Mycol., 1970, 62 : 359—364.
- Hendrix F. F., Jr. A new heterothallic *Pythium* from United States and Canada. Mycol., 1968, 60 : 802—805.
- Hendrix F. F., Jr., Campbell A. A. A new species of *Pythium* with spiny oogonia. Mycol., 1969, 61 : 387—391.
- Hendrix J. W. Influence of sterol on growth and reproduction of *Pythium* and *Phytophthora* sp. Phytopathol., 1965, 55 : 790—797.
- Hidalgo-Quimio T. Z. The host-range and host-parasite relationship of the chytrid *Dictyomorpha* within the *Saprolegniaceae*. Philippine Agriculturist, 1965, ser. A, 49 : 95—104.
- Hine R. B. The occurrence of aminoacids in four species of *Pythium*. Mycol., 1960, 52 : 378—380.
- Hine R. B. Effect of streptomycin and pimarinin on growth and respiration of *Pythium* species. Mycol., 1962, 54 : 640—646.
- Höhnk W. Mycologische Abwasserstudie. Veröff. Inst. Meeresforsch., Bremerhaven, 1958, 5 : 244—256.
- Höhnk W., Bock K. J. Ein Beitrag zur Ökologie der saprophytischen Wasserpilze. Veröff. Inst. Meeresforsch., Bremerhaven, 1954, 3 : 9—26.
- Horenstein E. A., Cantino E. C. Morphogenesis in and the effect of light on *Blastocladiella britannica* sp. nov. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1961, 44 : 185—198.
- Horenstein E. A., Cantino E. C. An effect of light on glucose uptake by the fungus *Blastocladiella britannica*. J. Gen. Microbiol., 1964, 37 : 59—65.
- Howard K. L., Johnson T. W., Jr. Aquatic fungi of Iceland: some filamentous, eucarpic and holocarpic species. Mycol., 1969, 61 : 496—510.
- Hudson H. J., Ingold C. T. Aquatic *Hyphomycetes* from Jamaica. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1960, 43 : 469—478.
- Hughes G. C. Seasonal periodicity of the *Saprolegniaceae* in the south-eastern United States. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1962, 45 : 519—531.
- Humphrey J. E. The *Saprolegniaceae* of the United States, with notes on other species. Trans. Amer. Philos. Soc., N. S., 1892 (1893), 17 : 63—148.
- Ichida A. A., Fuller M. S. Ultrastructure of mitosis in the aquatic fungus *Catenaria anguillulae*. Mycol., 1968, 60 : 141—155.
- Ingold C. T. Aquatic *Hyphomycetes* of decaying alder leaves. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1942, 25 : 339—417.
- Ingold C. T. Further observations on aquatic *Hyphomycetes* of decaying leaves. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1943a, 26 : 104—115.
- Ingold C. T. On the distribution of aquatic *Hyphomycetes* saprophytic on submerged decaying leaves. New Phytologist, 1943b, 43 : 139—143.
- Ingold C. T. Aquatic *Hyphomycetes*. Rapp. et Comm. 8th Internat. Bot. Congr., Mycol., Sect. 18—19, 1954, Paris : 62—66.
- Ingold C. T. Stream spora in Nigeria. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1956, 39 : 108—110.
- Ingold C. T. New aquatic *Hyphomycetes*: *Lemonniera brachycladia*, *Anguillospora crassa* and *Fluminispora ovalis*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1958, 41 : 365—372.
- Ingold C. T. Submerged aquatic *Hyphomycetes*. J. Quekett Microscop. Club, ser. 4, 1959a, 5 : 115—130.
- Ingold C. T. Fungi. In: Vistas in botany. Royal Bot. Gard., Kew., 1959b, 348—386.
- Ingold C. T. Aquatic spora of Omo Forest, Nigeria. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1959c, 42 : 479—485.
- Ingold C. T. Aquatic *Hyphomycetes* in Southern Rhodesia. Proc. and Trans. Rhod. Sci. Assoc., 1960, 48 : 49—53.
- Ingold C. T. Another aquatic spore-type with clamp connections. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1961, 44 : 27—30.
- Ingold C. T. A new species of *Ingoldia* from Britain. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1964, 47 : 103—107.
- Ingold C. T. Hyphomycete spores from mountain torrents. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1965, 48 : 453—458.
- Ingold C. T. The tetrastrate aquatic fungal spores. Mycol., 1966, 58 : 43—56.
- Ingold C. T. Spores from foam. Bull. Brit. Mycol. Soc., 1967, 1 : 60—63.
- Ingold C. T. More spores from river and streams. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1968, 51 : 137—143.
- Ingold C. T., Cox V. J. *Heliscus stellatus* sp. nov., an aquatic hyphomycete. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1957a, 40 : 155—158.
- Ingold C. T., Cox V. J. On *Tripaspermum* and *Campylospora*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1957b, 40 : 317—321.
- Ingold C. T., Dann V., McDougall P. J. *Tripaspermum campelopardus* sp. nov. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1968, 51 : 51—56.
- Ingold C. T., Ellis E. A. On some hyphomycete spores including those of *Tetracladium maxilliformis* from Wheatfen. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1952, 35 : 158—161.
- Ingold C. T., McDougall P. J., Dann V. *Volucrispora graminea* sp. nov. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1968, 51 : 325—328.
- Ingraham J. L., Emerson R. Studies of the nutrition and metabolism of the aquatic phycomycete *Allomyces*. Amer. J. Bot., 1954, 41 : 146—152.
- Iqbal S. H., Webster J. Pathogenicity of aquatic isolates of *Centrospora acerina* to carrots and parsnips. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1969, 53 : 487—490.
- Johns R. M. Studies on the Indian aquatic fungi. Proc. Indian Acad. Sci., sect. B, 1959, 50 : 253—258.
- Johns R. M. A new *Polyphagus* in algal culture. Mycol., 1964, 56 : 441—451.
- Johnson T. W., Jr. The asexual stage of *Apodachlya minima*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1955, 38 : 415—418.
- Johnson T. W., Jr. The genus *Achlya*: morphology and taxonomy. Univ. Michigan Press, Ann Arbor, 1956.
- Johnson T. W., Jr. A note on *Macrochytrium botrydioides* Minden. Arch. Microbiol., 1968, 63 : 292—294.

- Johnson T. W., Jr. Aquatic fungi of Iceland: *Olpidium* (Braun) Rabenhorst. Arch. Microbiol., 1969, 69 : 1—11.
- Jones E. B. G. Some aquatic *Hyphomycetes* in Yorkshire. Naturalist, 1965, 893 : 57—60.
- Jones E. B. G., Oliver A. C. Occurrence of aquatic *Hyphomycetes* on wood submerged in fresh and brackish water. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1964, 47 : 45—48.
- Kanouse B. B. Physiology and morphology of *Pythiormorpha gonapodioides*. Bot. Gaz., 1925, 79 : 196—206.
- Kanouse B. B. A monographic study of special groups of the water molds. I. *Blastocladiaceae*. Amer. J. Bot., 1927a, 14 : 287—306.
- Kanouse B. B. A monographic study of special groups of the water molds. II. *Leptomitaceae* and *Pythiormorphaceae*. Amer. J. Bot., 1927b, 14 : 335—357.
- Karling J. S. A saprophytic species of *Catenaria* isolated from roots of *Panicum variegatum*. Mycol., 1934, 26 : 528—543.
- Karling J. S. A further study of *Cladochytrium replicatum* with special reference to its distribution, host range and culture on artificial media. Amer. J. Bot., 1935a, 22 : 439—452.
- Karling J. S. *Tetracadium marchalianum* and its relation to *Asterothrix*, *Phycastrum* and *Cerasterias*. Mycol., 1935b, 27 : 478—495.
- Karling J. S. A new chytrid with giant zoospores *Septochytrium macrosporum* sp. nov. Amer. J. Bot., 1942, 29 : 616—622.
- Karling J. S. Brazilian chytrids. VI. *Rhopalophlyctis* and *Chytriomycetes*, two new chitinophilic operculate genera. Amer. J. Bot., 1945, 32 : 362—369.
- Karling J. S. Some zoosporic fungi of New Zealand. V. Species of *Asterophlyctis*, *Obelidium*, *Rhizoclostrum*, *Siphonaria* and *Rhizophlyctis*. Sydowia, 1966a (1968), 20 : 96—108.
- Karling J. S. Some zoosporic fungi of New Zealand. XIII. *Olpidiopsidaceae*, *Siropidiaceae* and *Lagenidiaceae*. Sydowia, 1966b (1968), 20 : 190—199.
- Karling J. S. Zoosporic fungi of Oceania. I. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1968, 84 : 166—178.
- Karling J. S. Zoosporic fungi of Oceania. VII. Fusions in *Rhizophlyctis*. Amer. J. Bot., 1969, 56 : 211—221.
- Karling J. S. Some zoosporic fungi of New Zealand. XIV. Additional species. Arch. Mikrobiol., 1970, 70 : 266—287.
- Kegel W. *Varicosporium elodeae*, ein Wasserpilz mit auffallender Konidienbildung. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 1906, 24 : 213—216.
- Kirk P. W., Jr. Aquatic *Hyphomycetes* on wood in an estuary. Mycol., 1969, 61 : 177—181.
- Klaveness D. *Blyttomyces helicus*, a phycomycete new to Norway. Nytt. mag. bot., 1970, 17 : 101—102.
- Kniep H. *Allomyces javanicus*, n. sp., ein anisogamer Phycomycet mit Planogameten. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 1929, 47 : 199—212.
- Kniep H. Über den Generationswechsel von *Allomyces*. Zeitschr. Bot., 1930, 22 : 433—441.
- Koch W. J. Two new chytrids in pure culture, *Phlyctochytrium punctatum* and *Phlyctochytrium irregulare*. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1957, 73 : 108—122.
- Kolkwitz R. Zur Biologie von *Leptomitus lacteus*. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 1901, 19 : 288—291.
- Kolkwitz R. Über Bau und Leben des Abwasserpilzes *Leptomitus lacteus*. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 1903, 21 : 147—150.
- Landa S., Eliášek J. Biologické odbourávací fenolů. III. Meziprodukty biologické oxydace pyrokatechinu plisni *Oospora*. Chem. listy, 1956, 50 : 1834.
- Landa S., Eliášek J. Biologické odbourávací dvojmocných fenolů. Sbor. Vysoké školy chem.-technol. v Praze, 1959, 3 : 35—53.
- Lloyd D. A record of two years, continuous observations on *Blastocladiella pringsheimii*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1938, 21 : 152—166.
- Lovett J. S., Cantino E. C. The relation between biochemical and morphological differentiation in *Blastocladiella emersonii*. II. Nitrogen metabolism in synchronous cultures. Amer. J. Bot., 1960, 47 : 550—560.
- Lukavský J. Observations on some parasite chytridiomycetes. Arch. Protistenk., 1970, 112 : 138—144.
- Machlis L. Growth and nutrition of water molds in the subgenus *Euallomyces*. I. Growth factor requirements. Amer. J. Bot., 1953a, 40 : 189—195.
- Machlis L. Growth and nutrition of water molds in the subgenus *Euallomyces*. II. Optimal composition of the minimal medium. Amer. J. Bot., 1953b, 40 : 450—460.
- Machlis L. Factors affecting the lag phase of growth of the filamentous fungus *Allomyces macrogynus*. Amer. J. Bot., 1957, 44 : 113—119.
- Machlis L., Crasemann J. M. Physiological variation between the generations and among the strains of water molds in the genus *Euallomyces*. Amer. J. Bot., 1956, 43 : 601—612.
- Machlis L., Ossia E. Maturation of the meiosporangia of *Euallomyces*. I. The effect of cultural conditions. Amer. J. Bot., 1953a, 40 : 358—365.
- Machlis L., Ossia E. Maturation of the meiosporangia of *Euallomyces*. II. Preliminary observations of the effect of auxins. Amer. J. Bot., 1953b, 40 : 465—468.
- Madelin M. F. Studies on the infection by *Coelomomyces indicus* of *Anopheles gambiae*. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1968, 84 : 115—124.
- Martin I. P. The use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. Soil Sci., 1950, 69 : 215.
- Marvanová L. *Lemonniera centrosphaera* sp. nov. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1968, 51 : 613—616.
- Marvanová L., Marvan P. Aquatic *Hyphomycetes* in Cuba. Česka mykol., 1969, 23 : 135—140.
- Miller C. E. Isolation and pure culture of aquatic *Phycomycetes* by membrane filtration. Mycol., 1967, 59 : 524—527.
- Miller C. E., Ristanovic B. Studies on saprolegniaceous filamentous fungi. Ohio J. Sci., 1969, 69 : 105—109.
- Minden M., von. Beiträge zur Biologie und Systematik ein heimischer submerser Phycomyceten. In: Falck R. Mykol. Untersuch. Berichte, 2, 1916, Jena : 146—255.
- Miura K., Kudo M. Y. An agar-medium for aquatic *Hyphomycetes*. Trans. Mycol. Soc. Japan, 1970, 11 : 116—118.
- Mullins J. T. The life cycle and development of *Dictyomorpha* gen. nov. (formerly *Pringsheimiella*), a genus of the aquatic fungi. Amer. J. Bot., 1961, 48 : 377—387.
- Mullins J. T., Barksdale A. W. Parasitism of the chytrid *Dictyomorpha dioica*. Mycol., 1965, 57 : 352—359.
- Nagai M., Kobayashi T. Notes on Japanese species of *Blastocladiella*. J. Fac. Agric. Iwate Univ., 1959, 4 : 115—125.
- Nauwerck A. Beitrag zur Kenntnis des Phytoplankton portugiesischer Gewässer. Bol. Annal. Soc. Broteriana (ser. 2 A), 1959, 33 : 223—231.
- Newby H. V. Observations on *Saprolegniaceae*. I. *Saprolegnia anisospora* De Bary. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1948a, 31 : 254—265.
- Newby H. V. Observations on *Saprolegniaceae*. II. *Saprolegnia paradoxa* Maurizio. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1948b, 31 : 266—270.
- Nilsson S. On some Swedish freshwater *Hyphomycetes*. Preliminary notes. Svensk bot. tidskr., 1958, 52 : 291—318.
- Nilsson S. Some aquatic *Hyphomycetes* from South America. Svensk bot. tidskr., 1962, 56 : 351—361.
- Nilsson S. Freshwater *Hyphomycetes*. Taxonomy, morphology and ecology. Symbol. Bot. Upsalensis, 1964, 18 : 5—130.
- Nolan R. A. Nutritional requirements for species of *Allomyces*. Mycol., 1969, 61 : 641—644.

- Nolan R. A. The phycomycete *Catenaria anguillulae*: growth requirements. J. Gen. Microbiol., 1970a, 60 : 167—180.
- Nolan R. A. Carbon source and micronutrient requirements of the phycomycete, *Catenaria anguillulae* Sorokin. Ann. Bot., N. S., 1970b, 34 : 927—939.
- Obel P. Researches on the condition of the forming of oogonia in *Achlya*. Annales mycologici (Berlin), 1910, 8 : 421—443.
- Ottová V. Mycophyta in polluted and waste waters. Vodní hospod., 1964, 14 : 19—20.
- Ottová V., Sládká A. A few methods for ascertainment of fungi. Vodní hospod., 1966, 16 : 433—436.
- Ottová-Svobodová V. Biocenosa plisni a hub v městských odpadních vodách. Sbor. Vysoké školy chem.-technol. v Praze, technol. vody, 1962, 6 : 563—571.
- Palatý J. Biologické čištění generátorových odpadních vod za použití Oospory. Sbor. Vysoké školy chem.-technol. v Praze, 1958, 2 : 259—281.
- Paterson R. A. Lacustrine chytridiaceous fungi from Maryland. Mycol., 1962, 54 : 694—703.
- Paterson R. A. Observations on two species of *Rhizophydium* from Northern Michigan. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1963, 46 : 530—536.
- Paterson R. A. Benthic and planktonic *Phycomycetes* from Northern Michigan. Mycol., 1967, 59 : 405—416.
- Perrott P. E. The genus *Monoblepharis*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1955, 38 : 247—282.
- Perrott P. E. Isolation and pure culture of *Monoblepharis*. Nature, 1958, 182 : 1322—1324.
- Perrott P. E. The ecology of some aquatic *Phycomycetes*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1960a, 43 : 19—30.
- Perrott P. E. *Ankistrocladium fuscum* gen. nov. sp. nov., an aquatic hyphomycete. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1960b, 43 : 556—558.
- Petersen R. H. *Culicidospora*, a new genus of aquatic aleuriosporous *Hyphomycetes*. Bull. Torrey Bot. Club, 1960, 87 : 342—347.
- Petersen R. H. Aquatic *Hyphomycetes* from North America. I. Aleuriosporae and key to the genera. Mycol., 1962, 54 : 117—151.
- Petersen R. H. Aquatic *Hyphomycetes* from North America. II. Aleuriosporae and Blastosporae. Mycol., 1963a, 55 : 18—29.
- Petersen R. H. Aquatic *Hyphomycetes* from North America. III. Phialosporae and miscellaneous species. Mycol., 1963b, 55 : 570—581.
- Pieters A. J. The relation between vegetative vigor and reproduction in some *Saprolegniaceae*. Amer. J. Bot., 1915, 2 : 529—576.
- Plaats-Niterink A. J. van der. The occurrence of *Pythium* in the Netherlands. I. Heterothallic species. Acta bot. neerl., 1968, 17 : 320—329.
- Poitras A. W. A preliminary report of the aquatic *Phycomycetes* for the Pittsburgh region of Western Pennsylvania. Proc. Pennsylvania Acad. Sci., 1955, 29 : 127—129.
- Price I. P., Talbot P. H. B. An aquatic hyphomycete in a lignicolous habitat. Austral. J. Bot., 1966, 14 : 19—23.
- Pringsheim N. Matériaux pour servir à la morphologie et à l'étude systématique des algues. II. Saprolegniées. Ann. sci. natur Paris, ser. 4, 1859, 11 : 349—371.
- Quantz L. Untersuchungen über die Ernährungsphysiologie einiger niederer Phycomyceten (*Allomyces kniepii*, *Blastocladiella variabilis* und *Rhizophlyctis rosea*). Jahrb. wiss. Bot., 1943, 91 : 120—168.
- Ranzoni F. V. Nutrient requirements for two species of aquatic *Hyphomycetes*. Mycol., 1951, 43 : 130—142.
- Ranzoni F. V. The aquatic *Hyphomycetes* of California. Farlowia, 1953, 4 : 353—398.
- Raper J. R. A method of freeing fungi from bacterial contamination. Science, 1937, 85 : 342.
- Reinboldt B. Über die Verteilung einiger niederer Phycomyceten in Erdboden. Arch. Mikrobiol., 1951, 16 : 177—200.
- Reischer H. S. Preservation of *Saprolegniaceae* by the mineral oil method. Mycol., 1949, 41 : 177—179.
- Reischer H. S. Growth of *Saprolegniaceae* in synthetic media. I. Inorganic nutrition. Mycol., 1951a, 43 : 142—156.
- Reischer H. S. Growth of *Saprolegniaceae* in synthetic media. II. Nitrogen requirements and the role of Krebs cycle acids. Mycol., 1951b, 43 : 319—327.
- Reisert P. S., Fuller M. S. Decomposition of chitin by *Chytrium* species. Mycol., 1962, 54 : 647—657.
- Riehl A. Beiträge zur Kenntnis algenparasitärer Phycomyceten. V. Eine Gallbildung verursachende Chytridiale: *Zygorhizidium vaucheriae* nov. sp. Biol. Zbl., 1967, 86 : 435—448.
- Roberts R. E. A study of the distribution of certain members of the *Saprolegniaceae*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1963, 46 : 213—224.
- Rothwell F. M. Nutritional requirements of *Phlyctorhiza variabilis*. Amer. J. Bot., 1956, 43 : 28—32.
- Salkin I. F. *Allochytridium expandens* gen. et sp. n.: growth and morphology in continuous culture. Amer. J. Bot., 1970, 57 : 649—658.
- Salkin I. F., Robertson J. A. Use of tissue culture chamber for developmental studies of aquatic *Phycomycetes*. Arch. Mikrobiol., 1970, 70 : 157—160.
- Salvin S. B. Preliminary report on the intergeneric mating of *Thraustotheca clavata* and *Achlya flagellata*. Amer. J. Bot., 1942, 29 : 674—676.
- Schade A. L. The nutrition of *Leptomitius*. Amer. J. Bot., 1940, 27 : 376—384.
- Schade A. L., Thimann K. V. The metabolism of the watermold, *Leptomitius lacteus*. Amer. J. Bot., 1940, 27 : 659—669.
- Schmitt J. A., Jr. Some observations on aquatic *Phycomycetes* from Lake Texoma and adjacent parts of Oklahoma. Southwest. Amer. Naturalist, 1967, 12 : 311—320.
- Scott W. W. A monograph of the genus *Aphanomyces*. Va. Agric. Exp. Sta. Bull., 1961, 151 : 1—95.
- Scott W. W., Powell J. R., Seymour R. L. Pure culture technique applied to the growth of *Saprolegnia* spp. on a chemically defined media. Virginia J. Sci., 1963, 14 : 42—46.
- Seymour R. L. The genus *Saprolegnia*. Jena, 1970.
- Shanor L. Studies in the genus *Olpidopsis*. II. The relationship of *Pseudolpidium* Fischer and *Olpidopsis* (Cornu) Fischer. J. Elischa Mitchel Sci. Soc., 1939, 55 : 179—195.
- Shearer C. A., Crane J. L. Fungi of Chesapeake Bay and its tributaries. I. Patuxent river. Mycol., 1971, 63 : 237—260.
- Sherwood W. A. Sexual reactions between clonal subcultures of a strain of *Dictyuchus monosporus*. Mycol., 1969, 61 : 251—263.
- Sideris C. P. Taxonomic studies in the family *Pythiaceae*. I. *Nematosporangium*. Mycol., 1931, 23 : 252—295.
- Skucas G. P. Structure and composition of the resistant sporangial wall in the fungus *Allomyces*. Amer. J. Bot., 1967, 54 : 1152—1159.
- Skucas G. P. Changes in wall and internal structure of *Allomyces* — resistant sporangia during germination. Amer. J. Bot., 1968, 55 : 291—295.
- Sládečková A. Aquatic *Deuteromycetes* as indicator of starch campaign pollution. Internat. Rev. Ges. Hydrobiol. und Hydrographie, 1963, 48 : 35—42.
- Sládká A. Huby pomyjny. Mykol. sbor., 1966, 43 : 135—138.
- Sládká A., Ottová V. The most common fungi in biological treatment plants. Hydrobiol., 1968, 31 : 350—362.
- Slifkin M. K. Parasitism of *Olpidopsis incrassata* on members of the *Saprolegniaceae*. I. Host range and effects of light, temperature and stage of host on infectivity. Mycol., 1961, 53 : 183—193.

- Slifkin M. K. A new method for the purification and preservation of *Olpidopsis incrassata*. Mycol., 1962, 54: 105—106.
- Slifkin M. K. Parasitism of *Olpidopsis incrassata* on members of the *Saprolegniaceae*. II. Effect of pH and host nutrition. Mycol., 1963, 55: 172—182.
- Slifkin M. K. Nuclear division in *Saprolegnia* as revealed by colchicine. Mycol., 1967, 59: 341—345.
- Slifkin M. K. The effect of colchicine on *Olpidopsis incrassata* and its host *Saprolegnia delicata*. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1968, 84: 184—186.
- Smith N. R., Dawson V. T. The bacteriostatic action of rose bengal in media used for the plate counts of soil fungi. Soil Sci., 1944, 58: 467.
- Šolin V. Biologické odbourávání fenolů b-coli a plisnemi. Vodní hosp., 1955 (1956), 5: 23—29.
- Sparrow F. K. Two new chytridiaceous fungi from Cold Spring Harbor. Amer. J. Bot., 1931a, 18: 615—623.
- Sparrow F. K. Two new species of *Pythium* parasitic in green algae. Ann. Bot., 1931b, 45: 257—277.
- Sparrow F. K. The *Monoblepharidales*. Ann. Bot. (London), 1933, 47: 517—542.
- Sparrow F. K. A contribution to our knowledge of the aquatic *Phycomycetes* of Great Britain. J. Linnean Soc. London (Bot.), 1936, 50: 417—478.
- Sparrow F. K. Aquatic *Phycomycetes*, exclusive of the *Saprolegniaceae* and *Pythium*. Univ. of Michigan Press, Ann Arbor, 1943.
- Sparrow F. K. *Podochytrium cornutum* n. sp. the cause of an epidemic on the planktonic diatom *Stephanodiscus*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1951, 34: 170—173.
- Sparrow F. K. A further contribution to the phycomycete flora of Great Britain. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1957, 40: 523—535.
- Sparrow F. K. Aquatic *Phycomycetes*. 2nd revised ed. Univ. Michigan Press, Ann Arbor, 1960.
- Srivastava G. C. Ecological studies of some aquatic fungi of Gorakhpur, India. Hydrobiol., 1967, 30: 385—404.
- Stanier R. Y. The cultivation and nutritional requirements of a chytridiaceous fungus, *Rhizophlyctis rosea*. J. Bacteriol., 1942, 43: 499—520.
- Suzuki S., Nimura H. The microbiological studies of the lakes of Volcano Bandai. II. Ecological study of aquatic *Hyphomycetes* in the Goshikinuma and Akanuma Lake group. Bot. Mag. (Tokyo), 1960a, 73: 360—365.
- Suzuki S., Nimura H. Waterworks and Sewer. Assoc., 1960b, 313: 85—88.
- Suzuki S., Nimura H. Relation between the distribution of aquatic hyphomycetes in Japanese lakes and lake types. Bot. Mag. (Tokyo), 1961, 74: 51—55.
- Tabak H. H., Cooke W. B. Growth and metabolism of fungi in an atmosphere of nitrogen. Mycol., 1968, 60: 115—140.
- Thakur J., Dayal R. The occurrence and distribution of reproductive spores of *Saprolegniales* in certain ponds of Varanasi. Nova Hedwigia, 1966, 12: 509—517.
- Thornton D. R. The physiology and nutrition of some aquatic *Hyphomycetes*. J. Gen. Microbiol., 1963, 33: 23—31.
- Thornton D. R. Amino acids analysis of fresh leaf litter and the nitrogen nutrition of some aquatic hyphomycetes. Canad. J. Microbiol., 1965, 11: 657—662.
- Thornton D. R., Fox M. H. The free amino acid pools of two aquatic *Hyphomycetes*. Experientia, 1968, 24: 393—394.
- Tiffney W. N. The identity of certain species of the *Saprolegniaceae* parasitic to fish. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1939a, 55: 134—152.
- Tiffney W. N. The host range of *Saprolegnia parasitica*. Mycol., 1939b, 31: 310—331.
- Tiffney W. N., Wolf F. F. *Achlya flagellata* as a fish parasite. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1937, 53: 298—300.
- Tiegs E. Beiträge zur Ökologie der Wasserpilze. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 1919, 37: 496—501.
- Toma N. *Dictyuchus missouriensis* Couch, a new species in the European flora and the description of a new variety. Rev. roum. biol., ser. bot., 1970, 15: 251—258.
- Tubaki K. Studies on the Japanese *Hyphomycetes*. III. Aquatic group. Bull. Nat. Sci. Mus., Tokyo, 1957, 3: 249—268.
- Tubaki K. On the Japanese aquatic *Hyphomycetes*. Scum and foam group, referring to the preliminary survey of the snow group. Nagaoa, 1960, 7: 15—28.
- Umphelett C. J. Morphological and cytological observations on the mycelium of *Coelomomyces*. Mycol., 1962, 54: 540—554.
- Umphelett C. J. Development of the resting sporangia of two species of *Coelomomyces*. Mycol., 1964, 56: 488—497.
- Umphelett C. J., Holland M. M. Resting spores in *Phlyctochytrium planicorne*. Mycol., 1960, 52: 429—435.
- Unestam T. Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. I. Some factors affecting growth in vitro. Physiol. plant., 1965, 18: 483—505.
- Unestam T. Studies on the physiology of *Monoblepharis*. Physiol. plant., 1966, 19: 1—14.
- Unestam T., Gleason F. H. Comparative physiology of respiration in aquatic fungi. II. The *Saprolegniales*, especially *Aphanomyces astaci*. Physiol. plant., 1968, 21: 573—588.
- Vaartaja O. Occurrence of falcate antheridia in *Pythium* species, particularly in *P. irregulare* and its synonym, *P. polymorphon*. Mycol., 1967, 59: 870—877.
- Volkon'sky M. Sur l'assimilation des sulfates par les Champignons; eutrophie et parathiotrophie. C. R. Acad. Sci. Paris, 1933, 197: 712—714.
- Wagner D. T. S., Dawes C. J. Revision of the systematic position of *Saprochaete saccharophila*. Mycol., 1970, 62: 791—796.
- Waksman S. A. A method for counting the number of fungi in soil. J. Bacteriol., 1922, 7: 339.
- Ward M. W. Observation on a new species of *Thraustotheca*. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1939a, 55: 346—351.
- Ward M. W. Observations on *Rhizophlyctis rosea*. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1939b, 55: 353—360.
- Webster J. *Nectria lugdunensis* sp. nov., the perfect stage of *Heliscus lugdunensis*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1959a, 42: 322—327.
- Webster J. *Tricellula aquatica* sp. nov., an aquatic hyphomycete. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1959b, 42: 416—420.
- Webster J. The *Mollisia* perfect stage of *Anguillospora crassa*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1961, 44: 559—564.
- Webster J. A mechanical aid to maintaining cultures of aquatic fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1965a, 48: 447—448.
- Webster J. The perfect state of *Pyricularia aquatica*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1965b, 48: 449—452.
- Whiffen A. J. A new species of *Nephrochytrium*: *Nephrochytrium aurantium*. Amer. J. Bot., 1941a, 28: 41—44.
- Whiffen A. J. Cellulose decomposition by the saprophytic chytrids. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1941b, 57: 321—329.
- Whiffen A. J. Nutritional studies of representatives of five genera in the *Saprolegniaceae*. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1945, 61: 114—123.
- Willén T. Conidia of aquatic *Hyphomycetes* amongst plankton algae. Bot. Not., 1958, 111: 431—435.
- Willoughby L. G. Studies on soil chytrids. I. *Rhizidium richmondense* sp. nov. and its parasites. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1956, 39: 125—141.

- Willoughby L. G. Studies on soil chytrids. III. On *Karlingia rosea* Johanson and multioperculate chytrid parasitic on *Mucor*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1958, 41 : 309—319.
- Willoughby L. G. A pure culture of *Chytriumyces aureus* Karling. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1959a, 42 : 67—71.
- Willoughby L. G. A species of *Blastocladiella* from Great Britain. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1959b, 42 : 287—291.
- Willoughby L. G. The ecology of some lower fungi at Esthwaite water. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1961a, 44 : 305—332.
- Willoughby L. G. Chitinophilic chytrids from lake muds. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1961b, 44 : 586—592.
- Willoughby L. G. The fruiting behaviour and nutrition of *Cladochytrium replicatum* Karling. Ann. Bot., N. S., 1962a, 26 : 13—36.
- Willoughby L. G. The occurrence and distribution of reproductive spores of *Saprolegniales* in fresh water. J. Ecol., 1962b, 50 : 733—759.
- Willoughby L. G. Atlantic salmon disease fungus. Nature, 1968a, 217 : 872—873.
- Willoughby L. G. Ecological work on the lower fungi in freshwater — substrate relationships. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1968b, 3 : 125—130.
- Willoughby L. G. Mycological aspects of a disease of young perch in Windermere. J. Fish. Biol., 1970, 2 : 113—116.
- Woolkerling W. J., Baxter J. W. Aquatic hyphomycetes of Wisconsin: distribution and ecology. Mycopathol. et mycol. appl., 1968, 35 : 33—36.
- Yaw R. E., Cutter V. M., Jr. Crosses involving biochemically deficient mutants of *Allomyces arbuscula*. Mycol., 1951, 43 : 156—161.
- Zanardi D., Ciferri R., Scardavi A. Sostanze azotate e glucidiche nella nutrizione dei Ifomiceti acquatici. Atti Ist. Bot. della Univ. Lab. Criptogam. Pavia, ser. 5, 1960, 17 : 151—159.
- Ziegler A. W. Meiosis in *Saprolegniaceae*. Amer. J. Bot., 1953, 40 : 60—66.

Глава II

Исследование грибов, обитающих в соленых (морских) водоемах

Грибы, обитающие в соленых маршах, эстуариях, морях, океанах и в грунтах и илах, а также в озерах с соленой и солоноватой водой, в литературе часто обозначаются как морские. Таким образом термин «морские грибы» имеет весьма широкий смысл. Морские грибы — большая экологическая группа главным образом микромикетов, включающая значительное количество представителей из классов *Phycomycetes*, *Ascomycetes*, *Deuteromycetes* и небольшое из класса *Basidiomycetes*.

Ряд исследователей предлагают объединять все виды грибов, принадлежащие к разным систематическим группам, но сходные по своей экологии (живущие в морской воде), под названием *Thalassiomycetes*.

Морские грибы-сапрофиты всех классов развиваются преимущественно на всевозможных погруженных в воду растительных остатках — древесине, гниющих макроводорослях, высших растениях типа *Zostera*, *Thalassia*, *Posidonia*, *Juncus*, *Spartina* и др., которые встречаются непосредственно в морской воде, грунтах и илах литоральной и сублиторальной зоны, а также в соленых маршах и на песчаных дюнах, периодически подвергающихся воздействию морской воды (Sutherland, 1914, 1915a, 1915b, 1916a, 1916b, цит. по: Wilson, 1960; Elliott, 1930; Sparrow, 1937; Barghoorn, Linder, 1944; Wilson, 1951, 1960; Höhnk, 1952, 1953, 1954, 1955; Höhnk, Aleem, 1953; Ritchie, 1954; Harder, Ubelmesser, 1955; Chester et al., 1956; Johnson, 1956; Meyers, 1957, 1969; Grein, Meyers, 1958; Te Starke, 1959; Sparrow, 1960; Johnson, Sparrow, 1961; Goldstein, 1963a, 1963b; Orpurt et al., 1964; Meyers, Simms, 1965; Tubaki, 1969, и мн. др.).

Паразитные морские грибы развиваются на различных представителях морской фауны, в том числе на губках (Galtsoff, 1940), креветках (Phaff et al., 1952), крабах (Atkins, 1929, 1954a, 1954b, 1955; Couch, 1942), на моллюсках (Hunter, 1920; Kobayashi et al., 1953; Davis et al., 1954; Hewatt, Andrews, 1954; Vishniak, 1955a, 1958), на таких рыбах, как сельдь, макрель, камбала (Sproston, 1944), и на копеподах в зоопланктоне (Apstein, 1911; Jepps, 1937; Vallin, 1951). Весьма многочисленны грибы-паразиты на

различных морских водорослях, как микроскопических (в основном диатомовых и нитчатках), так и макроскопических (Sparrow, 1960; Johnson, Sparrow, 1961). Морские грибы-паразиты в большинстве своем относятся к различным порядкам класса *Phycomycetes*; облигатно-паразитные виды грибов из классов *Ascomycetes* и *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*) встречаются значительно реже. Степень паразитизма у морских грибов весьма различна. Наряду с облигатными паразитами с узкой специализацией по отношению к растению-хозяину или животному, встречаются факультативные сапрофиты и факультативные паразиты. В связи с тем что последние обычно ведут сапрофитный образ жизни и лишь при особых условиях переходят к паразитному, методы их исследования описываются в разделе, касающемся методов исследования морских грибов-сапрофитов.

Этим систематическим и биологическим разнообразием представителей экологической подгруппы морских грибов определяется и сравнительное разнообразие методов их сбора, выделения и культивирования на питательных средах различного состава.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРСКИХ ГРИБОВ-САПРОФИТОВ

Сапрофитные морские грибы, подобно другим грибам-сапрофитам, относятся к числу организмов с широким диапазоном приспособления к различным источникам питания, т. е. к субстратам. Однако широта приспособляемости у них не беспредельна. Более того, у видов, относящихся к разным систематическим группам, она различна, что выражается в приуроченности их к определенным субстратам, хотя, конечно, эта приуроченность довольно относительна по сравнению с грибами-паразитами. Наличие приуроченности морских сапрофитных грибов к определенным субстратам позволяет для сбора некоторых из этих грибов применить вышеописанный метод приманок. Учитывая набор субстратов, на которых обычно развиваются морские сапрофитные грибы, некоторые из этих субстратов применяют как приманки для обнаружения грибов в морской воде.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО СБОРУ, ВЫДЕЛЕНИЮ И КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ГРИБОВ-САПРОФИТОВ ИЗ КЛАССА *PHYCOMYCETES* (рис. 15—17)

Сбор морских грибов-сапрофитов класса *Phycomycetes* проводится аналогично сбору фикомицетных грибов-сапрофитов из пресных водоемов. Для выявления этих грибов либо собирают батометрами, пробоотборниками и драгами растительные и живот-

ные остатки из морской воды, которые сразу же микроскопируют, либо отбирают пробы воды, в которые затем в лаборатории помещают различные приманки. В качестве приманок для обнаружения в пробах морской воды представителей класса *Phycomycetes* используются всевозможные субстраты, в том числе пыльца различных растений (*Pseudotsuga taxifolia*, *Phyllocladus trichomanoides*, *Liquidambar styraciflua*, *Pinus* spp. и др.), споры хвощей и папоротников (*Lycopodium*, *Asplenium*, *Dryopteris* и др.), семена мака, риса, конопли, льна, прокипяченные листья злаков (*Zea mays*, *Poa pratensis*, *Phragmites* sp. и др.), солома злаков, убитые теплом талломы различных водорослей, как морских, так и пресноводных, древесина, целлофан, волосы, хитиновые покровы речного рака и морского краба, рыба чешуя, мертвые мухи и др. (Harder, Ubelmesser, 1955; Höhnk, 1958; Te Starke, 1959; Goldstein, 1960, 1963a; Sparrow, 1960; Johnson, Sparrow, 1961; Goldstein, Belsky, 1964; Gaertner, 1967a; Clokie, 1970, и др.). Долгое время единственным эффективным методом для выявления и идентификации грибов этой группы было прямое микроскопирование приманок. Однако в последние годы многократные попытки выделения чистых культур морских грибов класса *Phycomycetes* увенчались успехом, в результате чего были разработаны специальные методы выделения для ряда систематических, экологических и биологических группы фикомицетов.

Разнообразие специфических методов выделения объясняется необычайным многообразием представителей класса *Phycomycetes*. Так, в одной и той же систематической группе (пор. *Saprolegniales*) встречаются одноклеточные (сем. *Thraustochytriaceae*) и нитчатые, или филаментозные (мицелиальные) (сем. *Saprolegniaceae*), представители; в составе этих семейств в свою очередь имеются сапрофитные виды, встречающиеся в морской воде, на водорослях, на беспозвоночных, в донных илах и т. д. Почти в каждом конкретном случае для выделения данного вида гриба или небольшой группы видов разрабатывалась специальная методика. Поэтому в методическом отношении морские сапрофитные представители класса *Phycomycetes* исследованы очень неравномерно. Наиболее детально разработаны методы сбора и выделения морских грибов из семейств *Thraustochytriaceae*, *Ectogellaceae* и *Haliphthoraceae* (пор. *Saprolegniales*). Возможно, это объясняется тем, что в состав этих семейств входят преимущественно морские виды, в связи с чем исследователей привлекала перспектива разработки методов изучения группы монолитной как в отношении систематики, так и эколого-биологических особенностей. Методы выделения видов сем. *Saprolegniaceae*, встречающихся в морской воде и особенно часто в воде эстуариев, в основном совпадают с методами выделения этих грибов из пресных вод. Известны также методы сбора и выделения некоторых морских сапрофитных грибов — представителей пор. *Lagenidiales*. Значительно слабее изучены в методическом отно-

шении морские виды из порядков *Chytridiales*, *Anisochytriales* (*Hyphochytriales*), *Peronosporales*, *Entomophthorales* и др.

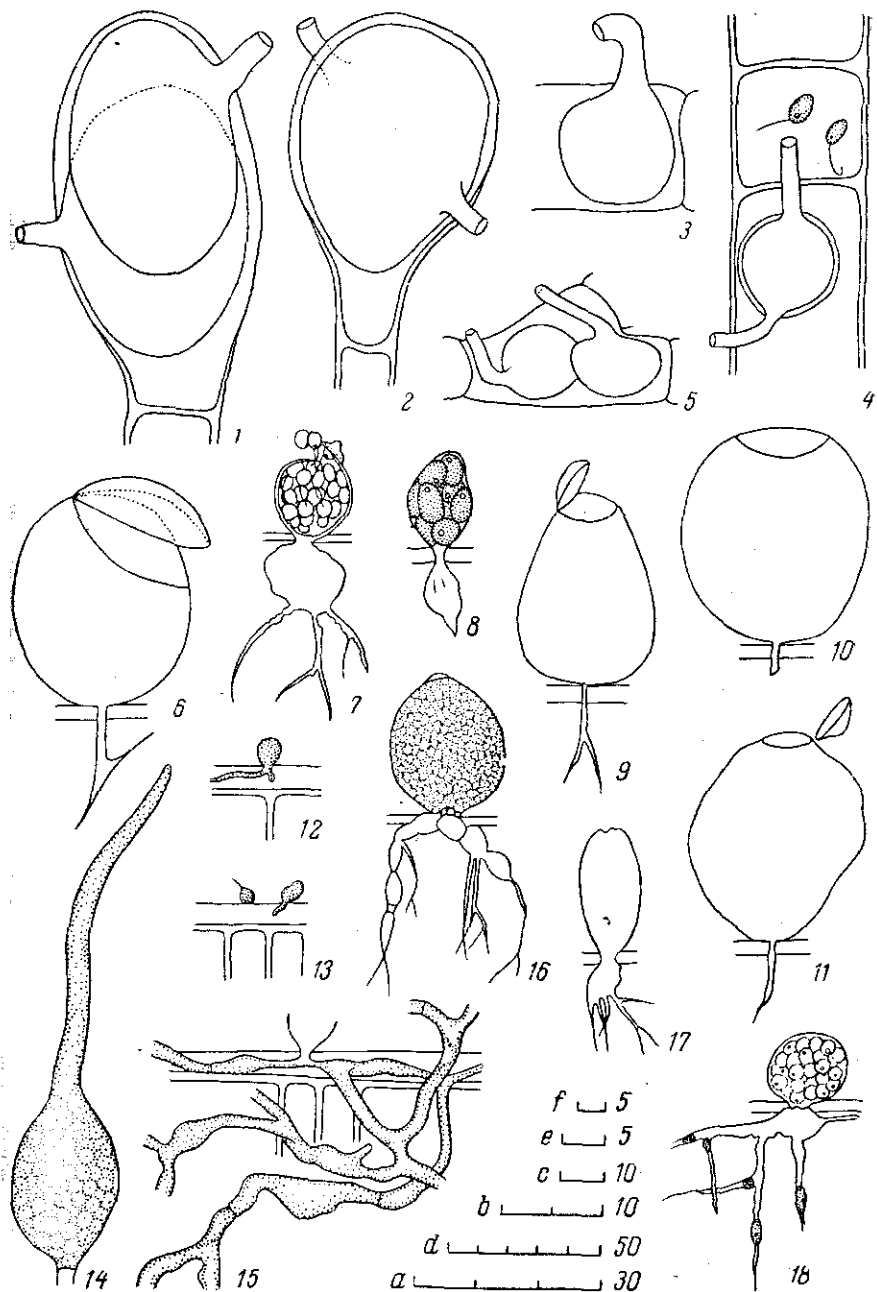
Для выделения фикомицетов из семейств *Lagenidiaceae* (пор. *Lagenidiales*), *Thraustochytriaceae* и *Haliphthoraceae* (пор. *Saprolegniales*) и некоторых других, обитающих в морских водоемах, применяется чашечный метод или метод пересевов на твердой агаризованной среде, впервые разработанный и примененный на практике Вишняк (Vishniac, 1955a, 1955b, 1958, 1960, и др.). В настоящее время этот метод в несколько видоизмененном виде используется для получения чистых культур не только представителей ряда систематических групп фикомицетов, которые встречаются как сапрофиты в морской воде, илах, на водорослях-макрофитах и высших растениях, но и для выделения морских миксомицетов (пор. *Plasmodiophorales*), а также дрожжей и плесневых грибов.

Фуллер с сотрудниками (Fuller et al., 1964, 1966) использовали модифицированный метод Вишняк для выделения морских фикомицетов — представителей семейств *Haliphthoraceae*, *Lagenidiaceae* и *Pythiaceae*, которые развиваются как сапрофиты, реже как факультативные паразиты на поверхности водорослей-макрофитов. Водоросли, собранные в зоне прилива, помещают в полиэтиленовые мешки и хранят их в холодильнике до лабораторной обработки. Нити или кусочки таллома водоросли (2 мм²) помещают на поверхность агаризованной среды в чашки Петри. К среде перед разливкой добавляют сухие антибиотики (пенициллин и стрептомицин) для подавления роста бактерий (Fuller et al., 1964), или же кусочки таллома водоросли перед посевом в течение 2 час. вымачивают в растворе, содержащем 0.5 г/л смеси пенициллина и стрептомицина (Fuller et al., 1966). Согласно исходной методике Вишняк (Vishniac, 1956), сухие антибиотики распыляют по поверхности разлитой в чашки среды. Чашки

Рис. 15—17. Фикомицеты, обнаруженные в морских водоемах и эстуариях.

Рис. 15. Грибы пор. *Chytridiales* (роды *Anisolpidium*, *Chytridium*, *Coenomycetes*, *Catenochytridium*, *Phlyctochytrium*).

1, 2 — *Anisolpidium sphacellarum*, опустошенные спорангии с экстраматричными выступающими выводными каналами; 3—5 — *Anisolpidium ectocarpii*: 3 — эндобиотический спорангий, 4 — прорастающая покоящаяся спора с двумя выводными каналами, 5 — два опустошенных спорангия; 6 — *Chytridium megastomum*, эпифитический, покрыпечный, опустошенный спорангий с атипичными ризоидами; 7 — *Chytridium lagenaria* var. *japonense*, эпифитический, покрыпечный спорангий с зооспорами, эндобиотическая апофиза с ризоидами; 8 — *Chytridium turbinatum*, эпифитический спорангий с зооспорами и кубовидным или кеглецидным ризоидом; 9—11 — *Chytridium polytrichiae*, эпифитический покрыпечный спорангий с простыми ризоидами; 12—15 — *Coenomycetes conchensis*: 12, 13 — стадии прорастания зооспоры и проникновение ее в субстрат, 14 — зрелый спорангий, 15 — часть гифальной системы внутри водоросли *Rivularia* sp.; 16 — *Catenochytridium carolinianum* f. *marinum*, эпифитический спорангий и эндобиотическая апофиза, состоящая из ряда сегментов; 17 — *Phlyctochytrium japonicum*, эпифитический спорангий и эндобиотические ризоиды; 18 — *Phlyctochytrium bryopsisidis*, эпифитический спорангий с зооспорами и развитыми ризоидами. Масштаб (в мкм): а — 1—4, 9—11, 14, 17, 18; б — 6, 12, 13, 15; в — 16; д — 5; е — 8; ф — 7.



с водорослями инкубируют в темноте при 20° в течение двух недель. На 3-й день инкубации и в последующие дни производится просмотр чашек на наличие грибов. Часть мицелия гриба, развившегося на агаризованной среде и по возможности лишенного бактериального загрязнения, пересевают на свежую стерильную среду, и так до тех пор, пока не получают одновидовую грибную безбактериальную культуру. Часть мицелия из такой культуры пересевают в пробирки с агаризованной средой, но без антибиотиков, и в этих пробирках сохраняют чистую культуру гриба.

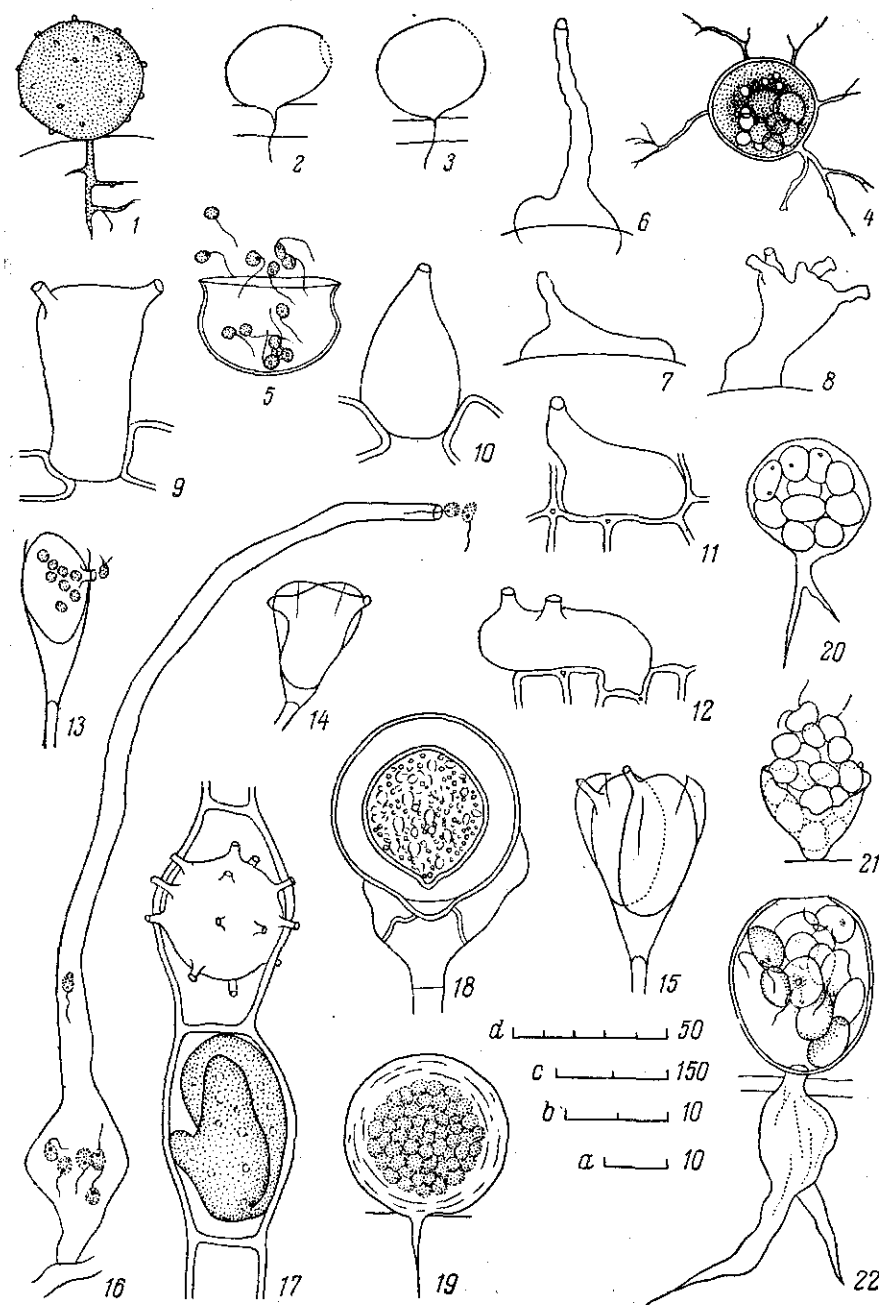
Дальнейшим усовершенствованием изложенных выше методов сбора и выделения морских фикомицетов, в частности представителей сем. *Thraustochytriaceae*, является метод, предложенный Бусом и Миллером (Booth, Miller, 1968), которые учли некоторые особенности морских представителей этого семейства, в частности их аэрофильность. По данному методу, собранные талломы водорослей-макрофитов помещают в сосуды, содержащие около 4 л морской воды и в течение 4 суток аэрируют их при 25–30°. Затем кусочки гниющих талломов водорослей извлекают чистыми пинцетами и переносят на агаризованную среду для выделения грибов. Последующая обработка материала производится так же, как и по методу Фуллера. Предварительная аэрация стимулирует более быстрое развитие колоний траустохитриевых грибов, поэтому чашки просматривают не на 3-й день после инокуляции, а не позже чем через 18 час. (Booth, Miller, 1968).

Вышеизложенные методы сбора и выделения морских фикомицетов, преимущественно из семейств *Thraustochytriaceae*, *Haliphthoraceae*, *Lagenidiaceae* и некоторых других, развивающихся как сапрофиты, реже как факультативные паразиты на талломах водорослей-макрофитов, широко применяются при качественном и количественном исследовании грибов этих групп, иногда с определенными модификациями (Gaertner, 1967a, 1968a; Clotie,

Рис. 16. Грибы пор. *Chytridiales* и *Saprolegniales* (роды *Rhizophyidium*, *Atkinsiella*, *Eurychasma*, *Ectrogella*, *Coenomyces*, *Leptolegnia*, *Eurychasmidium*, *Thraustochytrium*, *Japonochytrium*).

1 — *Rhizophyidium halophilum*, эпизитический спорангий с многочисленными сосочковидными выводными каналцами и эндобитическими ризоидом; 2, 3 — *Rhizophyidium cladophorae*, эпизитический спорангий с одним простым редуцированным ризоидом; 4, 5 — *Rhizorhynchus harderi*: 4 — спорангий с многочисленными разветвленными ризоидами, 5 — раскрытый спорангий; 6–8 — *Atkinsiella dubia*, три типа экстратрихальных спорангиев; 9–12 — *Eurychasma dicksonii*, спорангии с различным расположением выводных каналцев; 13–15 — *Ectrogella perforans*: 13 — эндобитический эллипсоидальный спорангий, 14, 15 — опустошенные спорангии; 16 — *Coenomyces consueus*, спорангий с очень удлиненным выводным каналцем; 17 — *Eurychasmidium tumefaciens*, два спорангия (нижний — созревающий, верхний — опустошенный); 18 — *Leptolegnia marina*, оогоний с ооспорой и с двумя антеридиями; 19 — *Thraustochytrium pachydermum*, зрелый сферический, толстостенный, эпизитический спорангий и простой ризоид; 20, 21 — *Thraustochytrium globosum*: 20 — зрелый спорангий, 21 — раскрывшийся спорангий; 22 — *Japonochytrium marinum*, зрелый спорангий с верхушечной порой и крупной эндобитической апофизой.

Масштаб (в мкм): а — 16, 18, 22; б — 1–3, 19–21; с — 4–8, 17; д — 9–15.



1970, и др.). Эти методы послужили для выделения с водорослей ряда видов морских фикомицетов из родов *Thraustochytrium*, *Haliphthoros*, *Atkinsiella*, *Lagenidium*, *Pythium* (Fuller et al., 1964, 1966; Booth, Miller, 1968; Clokie, 1970, и др.).

Траустохитриевые грибы, а также другие морские представители класса *Phycomycetes*, в частности многие хитридиевые, встречаются не только на поверхности водорослей-макрофитов. Их зооспоры распространены также непосредственно в морской воде. Для обнаружения морских фикомицетов-сапрофитов в морской воде и грунтах пригоден чашечный метод Вишняк, заключающийся в посеве проб воды и грунта на агаризованную среду. Однако концентрация зооспор и различных зачатков (диаспор) фикомицетов в морской воде недостаточно высока, чтобы эти грибы всегда можно было обнаружить таким путем. Предлагается два способа увеличения концентрации зооспор в морской воде: а) центрифугирование больших проб воды и использование центрифугата в качестве инокулюма (Fuller, Poytton, 1964) и б) мембранная фильтрация и использование образовавшегося на фильтре осадка в качестве инокулюма (Miller, 1967). Процедуры центрифугирования и фильтрации морской воды выполняются так же, как в случае пресной воды (см. главу I, стр. 16).

Помимо чашечного метода для выделения из морской воды и грунтов сапрофитных фикомицетов используется также метод приманок. Этот метод в общих чертах сходен с методом приманок, который применяется для выделения пресноводных фикомицетов. Пробы исследуемой морской воды разливаются в чашки Петри, куда добавляется пыльца *Liquidambar styraciflua*, *Pseudotsuga taxifolia*, *Phyllocladus trichomanoides*, *Pinus* spp. или же другие вышеперечисленные приманки. После образования таллома гриба на приманке производится его выделение в чистую культуру вновь на приманку в стерильной морской воде, а затем на твердую агаризованную среду (Couch, 1939).

С помощью этих методов — чашечного и приманок — из морской воды и грунтов выделены довольно многочисленные пред-

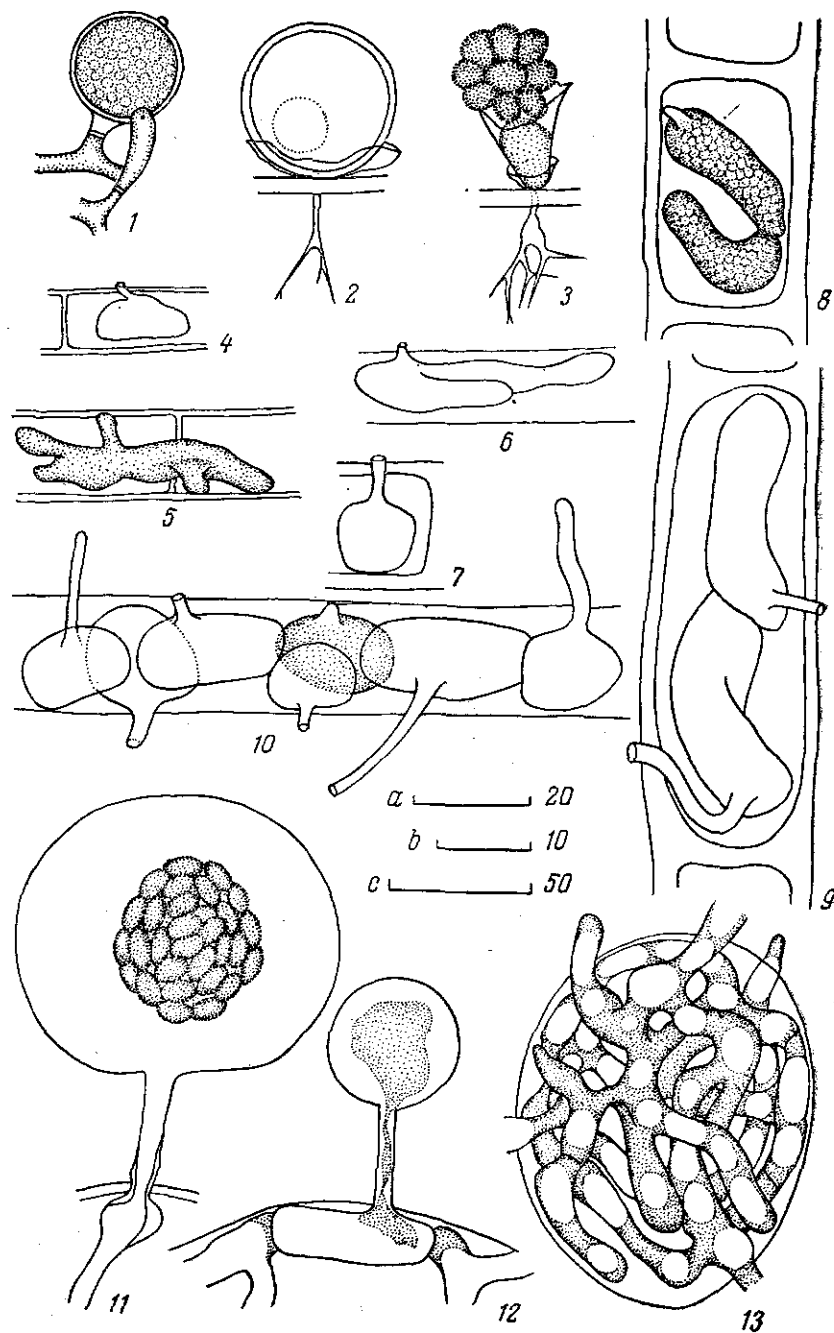


Рис. 17. Грибы пор. *Peronosporales*, *Saprolegniales*, *Lagenidiales* (роды *Pythium*, *Thraustochytrium*, *Petersenia*, *Pontisma*, *Sirolpidium*, *Lagenidium*).

1 — *Pythium marium*, созревающий оогоний и антеридий; 2, 3 — *Thraustochytrium proliferum*, 2 — эпизитическая покоящаяся спора, 3 — пролиферация спорангия и освобождающиеся зооспоры; 4—6 — *Petersenia lobata*: 4 — эндобитический спорангий, 5 — развивающийся эндобитический таллом, 6 — эндобитический спорангий после освобождения зооспор; 7—9 — *Pontisma lagenidioides*: 7 — эндобитический спорангий после освобождения зооспор, 8 — два развивающихся эндобитических таллома, которые превращаются в спорангии, 9 — два спорангия после освобождения зооспор; 10 — *Sirolpidium byrpsidis*, серия эндобитических спорангиев, один из которых в процессе созревания; 11 — *Lagenidium callinectes*, крупный экстраматриальный спорангий с небольшим объемом зооспор; 12, 13 — *Lagenidium chthamalophilum*: 12 — интраматриальный спорангий и экстраматриальный выводной канал с пузырьком, содержащим часть спорангиальной протоплазмы, 13 — вакуолизированные интраматриальные гифы. Масштаб (в мкм): а — 1, 7—11; б — 2, 3; в — 4—6, 12, 13.

ставители морских фикомицетов из родов *Thraustochytrium*, *Der-mocystidium*, *Schizochytrium*, *Atkinsiella*, *Lagenidium* и др. (Adair, Vishniac, 1958; Goldstein, 1963a, 1963b, 1963c; Fuller, Poytton, 1964; Goldstein, Belsky, 1964; Miller, 1967; Goldstein et al., 1969, и др.).

Культивирование типичных морских грибов из разных порядков класса *Phycomycetes*. Морские представители класса *Phycomycetes* в подавляющем большинстве являются стеногалитными грибами. В ходе адаптивной эволюции, которая у грибов этой группы проходила в условиях повышенной солености воды, у них выработалась потребность в солях, которые являются компонентами морской воды, в первую очередь в хлористом натрии и хлористом калии. Особенностью питательных сред для выращивания чистых культур морских фикомицетов, как и морских грибов из других систематических групп, является то, что они в обязательном порядке приготавливаются на естественной или искусственной морской воде. Культивируют их на питательных средах неопределенного химического состава, которые в большинстве случаев имеют универсальный характер, т. е. могут быть использованы для культивирования широкого лабра сапрофитных представителей разных порядков и семейств класса *Phycomycetes*. Для культивирования морских фикомицетов разработаны также среды определенного химического состава, или синтетические среды, которые обычно применяются для изучения физиологии исследуемых грибов.

П и т а т е л ь н ы е с р е д ы. Основной питательной средой сложного химического состава, которая находит широкое применение как для выделения, так и для культивирования морских фикомицетов, является среда Вишняк (Vishniac, 1955b, 1956). В состав этой среды входят: морская вода — 80—100 мл, глюкоза — 0.1 г, тиамин — 0.2 мг, Са-пантотенат — 0.1 мг, пиридоксамин (2HCl) — 0.02 мг, биотин — 0.5 мкг, фолиевая кислота — 2.5 мкг, гидролизат желатины — 0.1 г, экстракт печени — 1 мг, никотиновая кислота — 0.1 мг, пиридоксин (HCl) — 0.04 мг, *n*-аминобензойная кислота — 0.01 мг, цианкобаламин (B₁₂) — 0.05 мкг, агар — 1.5 г. К среде (100 мл) в обязательном порядке добавляют по 0.05 г пенициллина и стрептомицина, которые ингибируют развитие бактерий-загрязнителей. Средой Вишняк для выделения и культивирования морских фикомицетов пользуются многие исследователи. Некоторые из них предлагают модификации этой среды, дающие положительные результаты.

Фуллер и Пойтон (Fuller, Poytton, 1964) использовали для выделения морских фикомицетов среду Вишняк без экстракта печени; Фуллер с сотрудниками (Fuller et al., 1964) предложили заменить смесь витаминов группы В в среде Вишняк дрожжевым экстрактом. Модифицированная ими среда имеет следующий состав: гидролизат желатины — 1.0 г, экстракт печени — 0.1 г,

глюкоза — 1.0 г, дрожжевой экстракт — 0.1 г, агар — 12.0 г, естественная морская вода — 1 л с добавлением 0.5 г стрептомицина и 0.5 г пенициллина сразу же после стерилизации среды. Иногда применяют жидкий вариант этой среды (Fuller et al., 1966).

В настоящее время среда Вишняк в модификации Фуллера с сотрудниками довольно часто применяется для выделения и культивирования морских фикомицетов (Booth, Miller, 1968; Sparrow, Gotelli, 1969; Gaertner, 1970, и др.).

Кроме различных модификаций среды Вишняк существуют и другие среды неопределенного состава для выделения и культивирования морских фикомицетов, мало отличающиеся от среды Вишняк. Среда Улкен (Ulken, 1965), представляющая собой модифицированный вариант среды Оппенгеймера и Зобелла (Oppenheimer, Zobell, 1951) для выращивания культур морских бактерий, состоит из пептона — 1.0 г, дрожжевого экстракта — 2.0 г, фосфатов — 0.01 г, агара — 5.0 г и 1 л смеси морской и дистиллированной воды в отношении 3 : 1. Среда Буса и Миллера (Booth, Miller, 1968) имеет такой состав: гидролизат желатины — 1.0 г, экстракт печени — 0.5 г, глюкоза — 5.0 г, дрожжевой экстракт — 0.5 г, пептон — 1.0 г, агар — 12.0 г на 1 л морской воды. К жидкому варианту этой среды вместо 12.0 г агара добавляется только 1.0 г.

Вышеуказанные среды неопределенного химического состава послужили для выделения и культивирования ряда видов морских фикомицетов, в основном из семейств *Thraustochytriaceae*, *Haliphthoraceae*, *Lagenidiaceae*, *Pythiaceae* и др. (см. Приложение, табл. 4). Эти грибы, как видно из таблицы, обычно в естественных условиях, и в частности в морской воде, встречаются как сапрофиты, реже как факультативные паразиты на водорослях-макрофитах.

Их культивируют на средах более сложного химического состава как в обычных стационарных условиях, так и на качалках (Fuller et al., 1964, 1966; Booth, Miller, 1968, и др.). Условия культивирования отличаются в зависимости от задач исследования.

Получение чистых культур. Для получения однозооспоровых культур водных фикомицетов из первых трех семейств Фуллер с сотрудниками (Fuller et al., 1964) предложили метод, который заключается в следующем. Часть мицелия исследуемого гриба вместе с тонким слоем агаризованной среды извлекают из чашки или пробирки с однокришной безбактериальной культурой, толкут в морской воде, после чего 1 мл образовавшейся суспензии используют как инокулюм, который высевает в 125-миллилитровые колбы Эрленмейера с 50 мл жидкой среды Вишняк в модификации Фуллера. Гриб выращивают в этих колбах со средой на круговых качалках (120 об./мин.) при 20° в течение

12 час. После этого культуральную жидкость сливают, мицелий гриба промывают в трех порциях стерильной морской воды по 50 мл каждая и помещают в кристаллизатор со 100 мл стерильной морской воды, где наблюдается обильный выход зооспор из зооспорангиев. Одну зооспору, выделенную с помощью капиллярной пипетки, используют как инокулюм для получения однозооспоровой культуры. Зооспоры переносят либо непосредственно на поверхность агаризованной среды Вишняк в модификации Фуллера, либо на стерильный целлофан, помещенный на поверхность этой агаризованной среды.

Получение однозооспоровых культур необходимо для точной идентификации грибов. Эти культуры хороши также для наблюдения за стадиями развития морских фикомицетов, как нитчатых, так и моноцентрических. Для изучения последовательных стадий в цикле развития морских фикомицетов пригоден также метод культивирования этих грибов на пыльце *Liquidambar styraciflua* в морской воде (Booth, Miller, 1968). Получают культуры на пыльце следующим образом: в чашку Петри наливают стерильную морскую воду до уровня 1 см, на поверхность воды насыпают пыльцу и добавляют 1 мл инокулюма гриба. Через 24—48 час. на зернах пыльцы развиваются представители сем. *Thraustochytriaceae*. Для получения инокулюма на среде Буса и Миллера также выращивают односпоровые культуры грибов, но не из зооспор, а из одного таллома данного литамма гриба. Гриб культивируют на жидкой среде Буса и Миллера, разлитой по 50 мл в колбы Эрленмейера (объемом 250 мл). Колбы с инокулированными средами помещают на качалки для улучшения аэрации, а через 3 дня прекращают культивирование, и культуры, представляющие собой суспензию инокулюма, хранят в холодильнике при 7°.

Для точной идентификации питиевых грибов их выращивают на жидкой среде Вишняк в модификации Фуллера. В колбы Эрленмейера (125 мл) наливают по 50 мл среды, инокулируют их кусочком в 1 мм² агара с гифами мицелия, взятого из культуры гриба, выращенного на агаризованной среде. Колбы ставят на качалки при 23° в течение 72 час. Затем образовавшийся мицелий гриба, извлеченный из колб и тщательно промытый, помещают в кристаллизаторы со 100 мл смеси морской и дистиллированной воды в отношении 1 : 1, при комнатной температуре наблюдается обильный выход зооспор (Fuller et al., 1966). В дальнейшем процедура получения однозооспоровых культур питиевых грибов полностью соответствует таковой, описанной Фуллером для траустохитриевых, галифторовых и лагенидиевых грибов (Fuller et al., 1964). Как уже отмечалось, некоторые морские фикомицеты, обычно сапрофитные, в определенных условиях могут переходить к паразитному существованию, поражая живые ткани организма-хозяина. Для культивирования таких грибов — факультативных паразитов — используется метод вы-

ращивания их на дисках, вырезанных из талломов водоросли-хозяина. Так 16-миллиметровые диски из талломов нескольких видов водорослей рода *Porphyra*, из которых был выделен *Pythium* sp., помещают в чашки Петри со средой Вишняк в модификации Фуллера. Под диск или на него высевает инокулюм — 1 мм² агара с гифами гриба. Чашки Петри помещают в термостат при 23°. Через несколько дней на искусственно зараженных дисках водоросли *Porphyra* появляются симптомы инфекции (Fuller et al., 1966).

Культивирование нетипичных морских грибов из разных порядков класса *Phycomycetes*. Кроме облигатных морских фикомицетов в воде морей и океанов, а особенно часто в воде эстуариев встречаются нетипичные (т. е. факультативные) представители морской микрофлоры из сем. *Saprolegniaceae* (Couch, 1951, цит. по: Wilson, 1960, Hühnk, 1952, 1953; Te Starke, 1959; Johnson, Sparrow, 1961). Сбор и выделение их из соленых (морских) водоемов производятся теми же методами, что и из пресных водоемов (см. главу I).

Питательные среды. Для выделения и культивирования этих грибов, встречающихся в соленых и солоноватых водах морей и эстуариев, используются питательные среды неопределенного химического состава, отличающиеся от сред для выращивания и культивирования грибов, встречающихся в пресных водоемах. Отличие это состоит в том, что среды для культивирования сапролегниевых грибов, выделенных из соленых водоемов, готовят на морской воде. Обычная среда неопределенного химического состава для выделения и культивирования этих грибов из морей и эстуариев — агар с кукурузой мукой, приготовленный на естественной морской воде (Te Starke, 1959). В чашки Петри разливают по 25 мл этой среды, инокулируют гифами сапролегниевых грибов в центр агаровой пластинки и инкубируют в течение 96 час. при 10—35°.

Параллельно с разработкой рецептов питательных сред неопределенного химического состава для морских фикомицетов исследователи этой группы грибов создавали среды определенного химического состава — синтетические среды, которые используются в основном для культивирования морских фикомицетов с целью выяснения ряда особенностей физиологии питания и дыхания этих грибов, для установления солетолерантности и т. д.

Основной синтетической средой, которая применяется сейчас для культивирования морских фикомицетов, является глюкозо-глутаматная среда в модификации Вишняк (Vishniac, 1960). В состав этой многокомпонентной среды входят NaCl — 2.5 г, MgSO₄ · 7H₂O — 0.5 г, KCl — 0.1 г, KH₂PO₄ — 0.01 г, CaCO₃ — 0.02 г (для растворения ряда компонентов среды в нее вводится концентрированная серная кислота, она добавляется по одной капле до тех пор, пока раствор не становится прозрачным; сер-

ная кислота является растворителем для $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0.02 г), NaH -глутамат — 0.2 г, агар — 0.1 г, тиамин HCl — 1.0 мкг, цианкобаламин — 0.1 мкг. В среду также входят натриевая соль ЭДТА — 5.0 мг, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.05 мг, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.02 мг, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.01 мг, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2.0 мкг, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0.2 мкг, H_3BO_4 — 2.0 мкг, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 2.0 мкг на 100 мл дистиллированной воды. Среду, состоящую из вышеперечисленных компонентов, разливают в 25-миллилитровые колбы Эрленмейера по 10 мл в каждую и стерилизуют автоклавированием. В состав глюкозо-глутаматной среды входят также глюкоза — 0.2 г и NaHCO_3 — 0.01 г. Эти компоненты стерилизуют отдельно от среды и затем асептически вводят в колбы со средой; pH среды 7.4. Эта синтетическая среда использовалась для культивирования ряда морских фикомицетов из сем. *Thraustochytriaceae* (Goldstein, 1963a, 1963b, 1963c; Goldstein, Belsky, 1964; Belsky, Goldstein, 1965; Goldstein et al., 1965). В последнее время для культивирования ряда представителей морских фикомицетов, в частности морского гриба *Dermocystidium* sp., разработано еще несколько синтетических сред (Goldstein, Moriber, 1966; Goldstein et al., 1969; Gaertner, 1970). В ряде случаев это не вновь созданные среды, а модификации сред, ранее применявшихся для культивирования морских водорослей. Так, среда ASP_6 — среда Провасоли (Provasoli et al., 1957) для морских водорослей оказалась пригодной для культивирования *Dermocystidium* sp. (Goldstein et al., 1969). Данные о составе синтетических сред и выращенных на них морских фикомицетах сведены в табл. 4 (см. Приложение).

Условия культивирования морских фикомицетов на этих синтетических средах варьируют в зависимости от задач исследования. На глюкозо-глутаматной среде в модификации Вишняк (Vishniac, 1960) морские фикомицеты из родов *Thraustochytrium* и *Schizochytrium* обычно выращивают в темноте при 25° в течение 14 дней (Goldstein, 1963a, 1963b, 1963c; Goldstein, Belsky, 1964; Belsky, Goldstein, 1965, и др.). Эти грибы культивировали не только в колбах Эрленмейера (25 мл) с 10 мл среды в каждой, но также в пробирках, залитых средой наполовину. Морской фикомицет *Dermocystidium* sp. культивируют и на глюкозо-глутаматной среде в модификации Вишняк (Belsky a. Goldstein, 1965) и на среде ASP_6 (Goldstein et al., 1969) при 19—20°, в первом случае в течение 7 дней, во втором — 14 дней.

Из обзора методов сбора, выделения и культивирования морских грибов-сапрофитов класса *Phycomycetes* следует, что эти методы, в особенности методы выделения и культивирования, разработаны в деталях лишь для незначительной части видов. Выделение чистых культур этих грибов затруднено особенностями их морфологии и физиологии — крайне малыми размерами моноцентрических одноклеточных видов, коротким циклом их развития, избирательностью по отношению к субстратам-приманкам.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО СБОРУ, ВЫДЕЛЕНИЮ И КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ГРИБОВ-САПРОФИТОВ ИЗ КЛАССОВ *ASCOMYCETES* И *DEUTEROMYCETES* (*FUNGI IMPERFECTI*) (рис. 18—23)

Сбор. Для сбора сапрофитных сумчатых и несовершенных грибов, развивающихся на погруженной древесине в морской воде применяют метод приманок. В качестве приманок чаще всего используют блоки или панели из древесины различных пород, сложенные попарно и нанизанные по длине на 6-миллиметровую или 9.5-миллиметровую нейлоновую веревку, верхний конец которой укреплен на поплавке, а нижний заякорен. Впервые этот метод попарного складывания панелей был предложен Мейерсом (Meyers, 1953). Такое расположение панелей обеспечивает максимально возможную поверхность для заселения грибами, для последующего развития колонии и спороношения грибов (Meyers, Reynolds, 1960). Однако этот метод расположения панелей древесины не единственный. Хорошие результаты дают два других способа, предложенные Тубаки (Tubaki, 1966). Первый способ состоит в том, что панели размещают сериями по четыре в одной плоскости, причем каждая панель в серии удалена от другой на расстояние 2 см. Крепятся панели на пержавеющей стальной проволоке. Второй способ заключается в том, что панели сериями по 4—5 размещают друг над другом в специальных цилиндрической формы мешках из полиэтиленовой сетки, фиксируя их углами в отверстиях сетки. Первый способ применяется в основном в условиях прибрежных районов внутренних морей, где волнение воды не достигает большой силы, второй — на открытых, удаленных от берега участках морей. И в том, и в другом случаях серии панелей укрепляют на нейлоновой веревке, верхний конец которой присоединяют к резиновому буйку, а нижний заякоривают. До погружения в толщу воды панели сериями закладывают в бумажные мешки и стерилизуют в автоклаве текучим паром (без повышения давления) в течение 3 часов. Панели вынимают из мешков перед погружением их в воду.

Срок погружения в воду панелей может быть различным в зависимости от задач исследования — от двух недель до года и более. Минимальный срок погружения (две недели) обеспечивает довольно обильное обрастание панелей различными организмами, в том числе и грибами.

Порода древесины, из которой изготовлены блоки или панели, погружаемые в морскую воду для выделения морских сумчатых или несовершенных грибов-сапрофитов, также имеет определенное значение. Для выяснения пригодности использования в качестве приманки для морских сумчатых и несовершенных грибов была испытана древесина 35 видов древесных пород.

Оценка пригодности древесины, используемой в качестве приманки для указанных грибов, проводилась путем подсчета количества плодоносий двух наиболее часто встречающихся в морских водоемах (типично морских видов) сумчатых грибов-сапрофитов из родов *Lulworthia* и *Ceriosporopsis* и

двух видов несовершенных грибов-сапрофитов *Helicoma macrocephala* и *Trichocladium* sp. В результате оказалось, что наиболее пригодными для роста плодоношений исследованных сумчатых грибов была древесина ясеня белого, бальзы, самшита западноиндийского, тюльпанного дерева, скипидарной сосны и сосны восточной белой, а наименее пригодной — древесина черной вишни, кипариса болотного, красного дерева и др. Исследованные несовершенные грибы хорошо споронесли на древесине ели, липы американской, березы, кизила, падуба, тикового дерева, тюльпанного дерева, бальзы и совсем не споронесли на древесине кипариса болотного, красного дерева, дуба красного и др. Общая тенденция, отмеченная у сумчатых и несовершенных морских грибов, заключается в том, что они лучше развиваются на мягкой древесине. Древесина плотная, о которой известно, что она устойчива против гнилей, вызываемых наземными грибами, мало пригодна для развития морских сумчатых и несовершенных грибов (Johnson et al., 1959). Предлагаемые размеры панелей: 15×10×2, 10×13×2.5 или 5×5×2 см.

После извлечения панелей из морской воды они возможно скорее должны быть доставлены в лабораторию для последующей обработки. В специальных водонепроницаемых полиэтиленовых мешках, куда их помещают сразу же после извлечения из воды, панели можно держать не дольше одного дня (Tubaki, 1966).

Выделение и получение чистых культур морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов, развивающихся на древесине. Выделению чистых культур сумчатых и несовершенных грибов, уже развившихся на панелях или блоках древесины, предшествует обработка панелей. Их поверхность очищают от обрастаний тупым шпательным ножом, затем панели освобождают от лишней воды, тщательно промокая их стерильными бумажными тампонами, после чего просматривают под лупой, отмечая местонахождение плодовых тел и спорообразующих колоний стальными булавками. После такой предварительной обработки некоторые исследователи считают целесообразным перед выделением чистых культур грибов подвергнуть панели окончательному высушиванию (Johnson et al., 1959). Высушивание производится двумя путями. По одному, панели помещают в предварительно простерилизованный эксикатор на 24 часа, после чего древесину извлекают достаточно сухой, чтобы ее можно было использовать для выделения грибов. Второй путь является более рациональ-

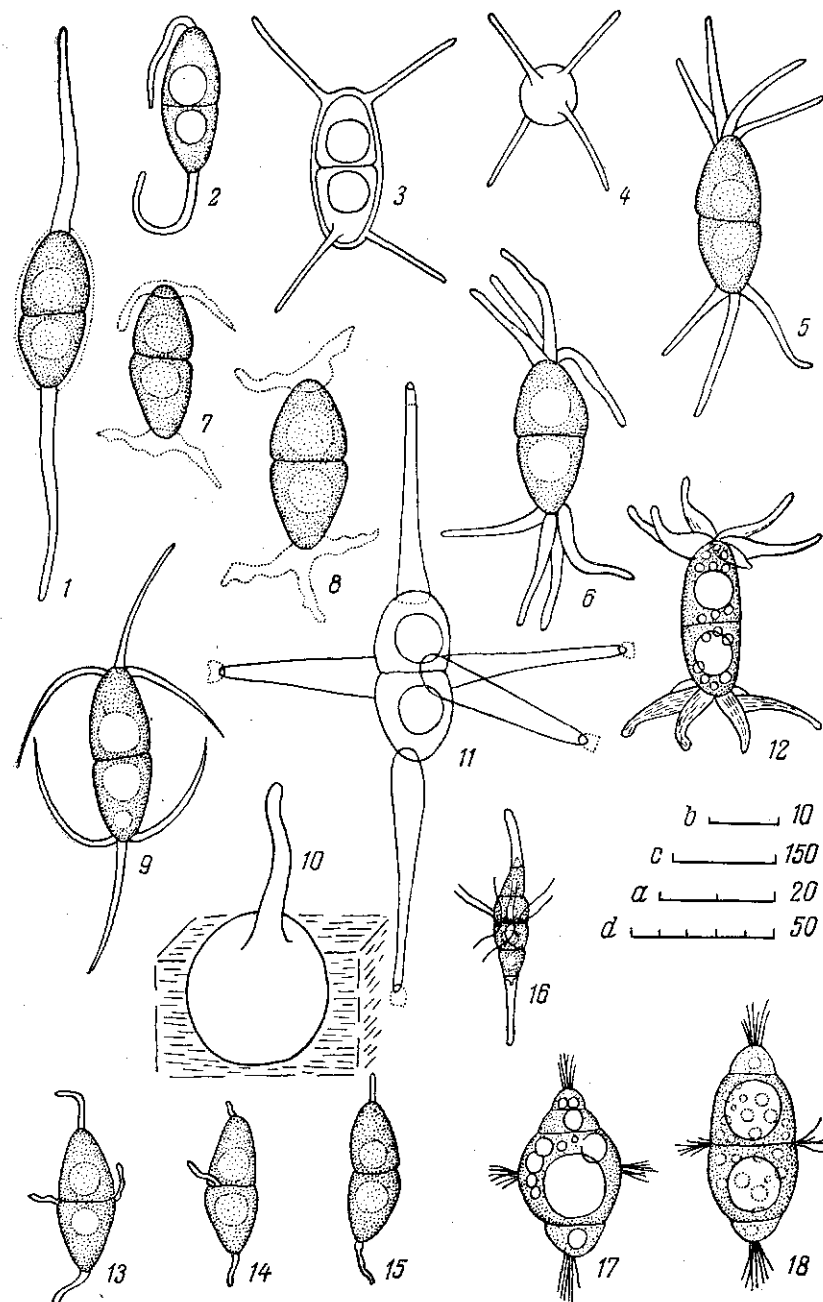


Рис. 18—22. Сумчатые грибы, обнаруженные в морских водоемах и эстуариях.

Рис. 18. Роды *Ceriosporopsis*, *Antennospora*, *Remispora*, *Arenariomyces*, *Halosphaeria*, *Peritrichospora*.

1 — *Ceriosporopsis cambrensis*, двухклеточная аскоспора с отростками; 2 — *Ceriosporopsis hamata*, двухклеточная аскоспора с крючковатыми отростками; 3, 4 — *Antennospora quadricornuta*: 3 — аскоспора с четырьмя отростками, 4 — аскоспора в поперечном разрезе; 5, 6 — *Remispora quadri-remis*, зрелые аскоспоры с отростками; 7, 8 — *Remispora maritima*, зрелые аскоспоры со слизевидными отростками; 9, 10 — *Arenariomyces trifurcatus*: 9 — аскоспора с длинными остроконечными терминальными отростками, 10 — перитеций с удлиненной шейкой; 11 — *Ceriosporopsis calyptrata*, аскоспора с крупными трубковидными отростками; 12 — *Remispora stellata*, аскоспора с пучками отростков на концах; 13—15 — *Halosphaeria appendiculata*, двухклеточные аскоспоры с маленькими единичными отростками; 16 — *Peritrichospora lacera*, четырехклеточная аскоспора с единичными отростками на концах и пучком тонких отростков посередине; 17, 18 — *Peritrichospora cristata* четырехклеточные аскоспоры с пучками коротких отростков на концах и посередине. Масштаб (в мкм): а — 1—9, 11, 13—15, 17, 18; б — 12; с — 10; д — 16.

ным в тех случаях, когда обрабатывается массовый материал. Панели с помеченными на них плодовыми телами аскомицетов и спороносящими колониями несовершенных грибов помещают перед потоком теплого воздуха из компрессора. Воздух этот предварительно пропускают через трубку с CaCl_2 , а затем через трубку, набитую стерильной ватой; панели помещают на расстоянии около 30 см от 13-миллиметрового отверстия трубки; за 2—3 часа они вполне подсыхают с поверхности. При таком подсушивании панелей, а иногда даже просто перед вентилятором (в полевых условиях), не наблюдалось случаев загрязнения панелей грибами из воздуха.

Другие исследователи (Meyers, Reynolds, 1960; Tubaki, 1966) считают, что для выделения чистых культур панели, после предварительной их обработки, не следует высушивать, а, наоборот, они должны быть помещены во влажную камеру на 3—4 недели при 20°, хотя в каждом конкретном случае срок инкубации в камере определяется исходным состоянием панели и скоростью, с которой на ней развивается основная и сопутствующая микрофлора. Однако такая инкубация, по мнению Мейерса и Рейнольдса, позволяет установить полный состав микрофлоры панелей, поскольку сразу после извлечения из морской воды многие грибы дают на панелях только мицелиальный рост без спороношения, которое образуется лишь при последующей инкубации. В течение инкубационного периода панели несколько раз просматривают под микроскопом или лупой для выявления новых развивающихся грибов.

Джонсон с сотрудниками (Johnson et al., 1959) предлагают свою конструкцию инкубационной камеры для деревянных панелей (10×15×2 см). Такую камеру можно изготовить из двух прямоугольных из пирексового стекла чашек 21—25 см. Дно одной чашки выстилается четырьмя-шестью слоями фильтровальной бумаги для ликвидации лишней воды из панелей, вторая чашка служит крышкой. Их связывают вместе, заворачивают бумагой и стерилизуют. В каждый инкубатор можно поместить две деревянные панели. Края чашек, в которые уже поместили панели, склеивают прозрачной лентой, и ставят камеру в термостат при 20°. В таких условиях достаточно 7—14 дней для интенсивного развития спороношений сумчатых и несовершенных грибов на поверхности инкубируемых панелей.

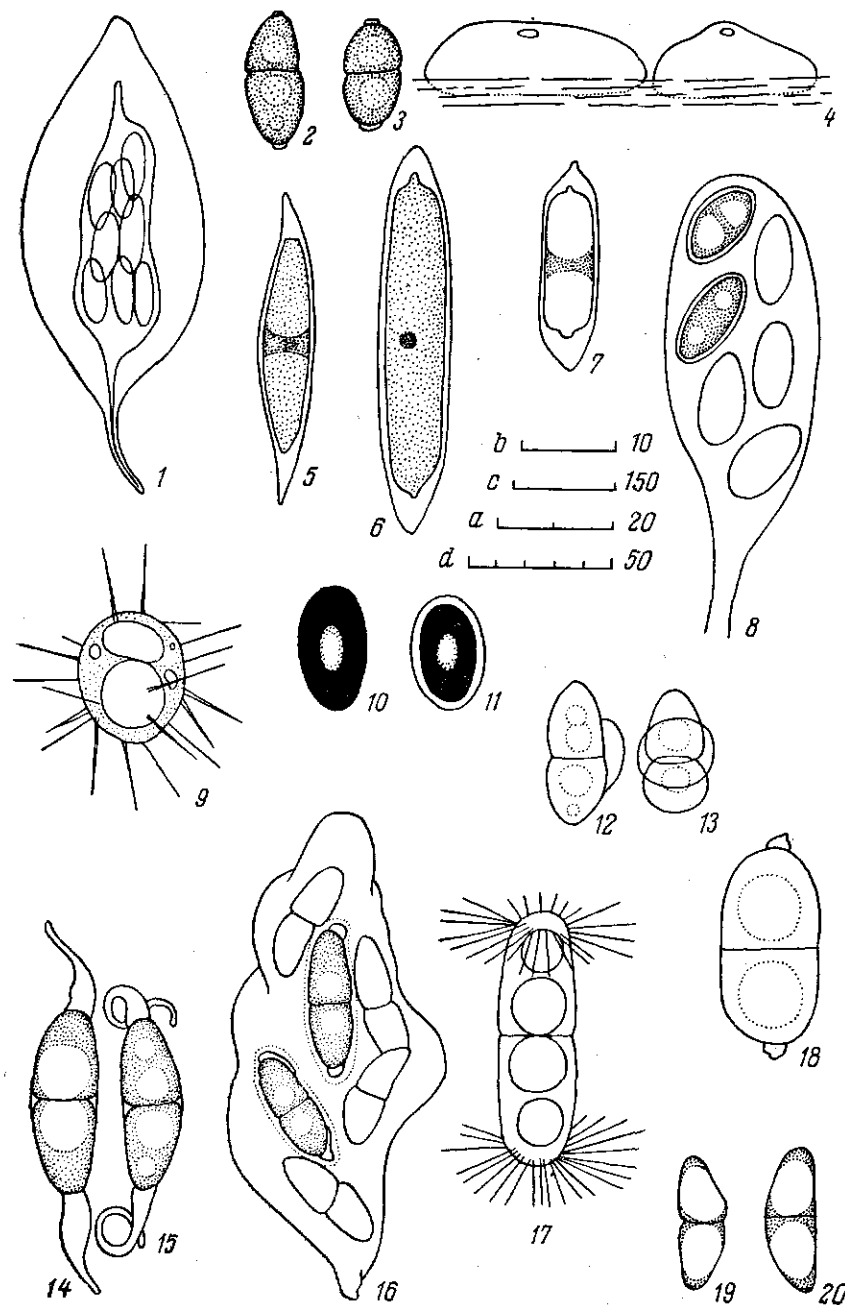


Рис. 19. Роды *Lentescospora*, *Haloguignardia*, *Guignardia*, *Plectolitus*, *Ceriosporopsis*, *Herpotrichiella*, *Gnomonia*, *Paratormyces*, *Rosellinia*.

1—4 — *Lentescospora submarina*: 1 — зрелая толстостенная сумка, 2, 3 — двухклеточные аскоспores, 4 — перитиции; 5 — *Haloguignardia decudua*, аскоспора; 6 — *Haloguignardia longispora*, аскоспора; 7 — *Haloguignardia irritans*, аскоспора; 8 — *Guignardia ulvae*, сумка с аскоспорами, две из них зрелые; 9 — *Plectolitus acanthosporum*, аскоспора; 10, 11 — *Rosellinia laminariana*, аскоспores; 12, 13 — *Paratormyces lentiferus*, аскоспores; 14—16 — *Ceriosporopsis halima*: 14, 15 — зрелые споры, 16 — зрелая сумка с аскоспорами; 17 — *Herpotrichiella ciliomaris*, аскоспора со щетинками; 18 — *Gnomonia marina*, двухклеточная аскоспора; 19, 20 — *Gnomonia longirostris*, двухклеточные аскоспores, одна с утолщением у поперечной перегородки. Масштаб (в мкм): а — 2, 3, 6, 7, 10—16; б — 5, 8, 9, 17—20; в — 4; д — 1.

Минимальный срок погружения панелей в морскую воду для выявления сумчатых и несовершенных грибов — 12 дней летом и 20 дней зимой. Но иногда в задачу исследования входит выявление грибов, которые могут развиваться на панелях при более длительном их погружении в морскую воду, например на 2 месяца и более — до 3 лет (Kohlmeier, 1969a). Такие панели очень сильно обрастают различными морскими организмами: водорослями, беспозвоночными; чистка их ножом не всегда удаляет эти обрастания полностью. В таком случае отбирают панели, наиболее свободные от организмов обрастаний, соскребают с них обрастания, тщательно промывают в проточной отфильтрованной морской воде и нейлоновой нитью связывают такую панель с совершенно чистой панелью, простерилизованной окисью пропилена. * Обе связанные панели погружают в танк (бак) с проточной морской водой и содержат там 2—3 недели, после чего новая панель используется для выделения сумчатых и несовершенных морских грибов в чистую культуру или же для инкубации перед выделением.

Выделение сумчатых и несовершенных морских грибов-сапрофитов с панелей на питательную среду производится следующим образом. Под микроскопом на панелях обнаруживают спороносящие колонии гифальных грибов (пор. *Hyphomycetales*), пикниды сферопсидальных грибов (пор. *Sphaeropsidales*) или перитеции сумчатых грибов, из которых выходит споровая масса. Простерилизованной обжиганием в пламени иглой собирают массу спор или конидий и точками или полосами наносят ее на поверхность агаризованной питательной среды, приготовленной для культивирования морских грибов, развивающихся на древесине (Meyers, 1953; Johnson et al., 1959; Johnson, Sparrow, 1961, и др.).

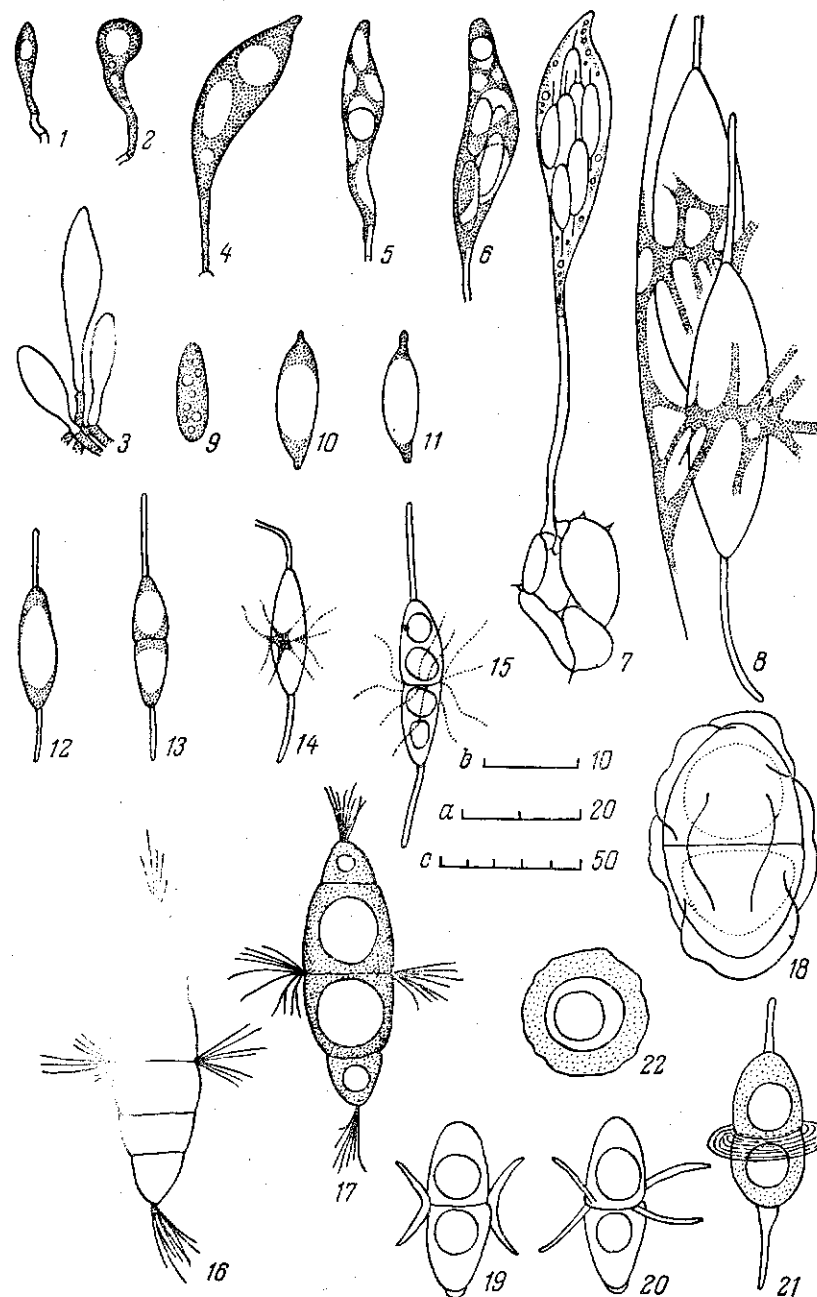
На панелях, которые перед выделением развивающихся на них сумчатых и несовершенных грибов подвергались высушиванию, споровая масса, выходящая из плодоношений грибов — пикнид и перитециев — отсутствует. Выделение этих грибов на питатель-

* Можно панели простерилизовать в автоклаве.

Рис. 20. Роды *Peritrichospora*, *Didymosamarospora*, *Halosphaeria*.

1—15 — *Peritrichospora integra*, стадии развития сумки и аскоспор: 1, 2 — сумки в начале развития, 3 — три сумки в начале развития на аскогенных гифах, 4, 5 — вакуолизация у молодых сумок, 6 — образование аскоспор в зрелых сумках, 7 — сумка со зрелыми аскоспорами, 8 — две аскоспоры с терминальными отростками, примыкающие к оболочке сумки, 9—11 — последовательные стадии развития терминальных отростков у аскоспор, 12 — зрелая аскоспора с терминальными отростками, 13 — зрелая аскоспора, септированная посередине, 14 — аскоспора с цитоплазматическими отростками посередине, 15 — зрелая аскоспора с экваториально расположенными ресничковидными отростками; 16, 17 — *Peritrichospora comata*, зрелые многоклеточные аскоспоры с пучками ресничек на концах и посередине; 18 — *Didymosamarospora euryhalina*, зрелая двуклеточная аскоспора со слизистой оболочкой; 19, 20 — *Halosphaeria mediosetigera*: 19 — аскоспора с лунообразными отростками с боков посередине, 20 — аскоспора с четырьмя отростками с боков посередине; 21, 22 — *Halosphaeria torquata*: 21 — зрелая двуклеточная аскоспора с слизеобразным кольцом возле поперечной перегородки, 22 — вид аскоспоры в поперечном разрезе.

Масштаб (в мкм): а — 9—15, 19—22; б — 8, 18; с — 1—7, 16, 17.



ную среду производится несколько иначе. Пикниду или перитеций гриба протыкают в одном-двух местах стерильной иглой, споры, выходящие из образовавшихся отверстий, собирают и высевают на поверхность агаризированной питательной среды.

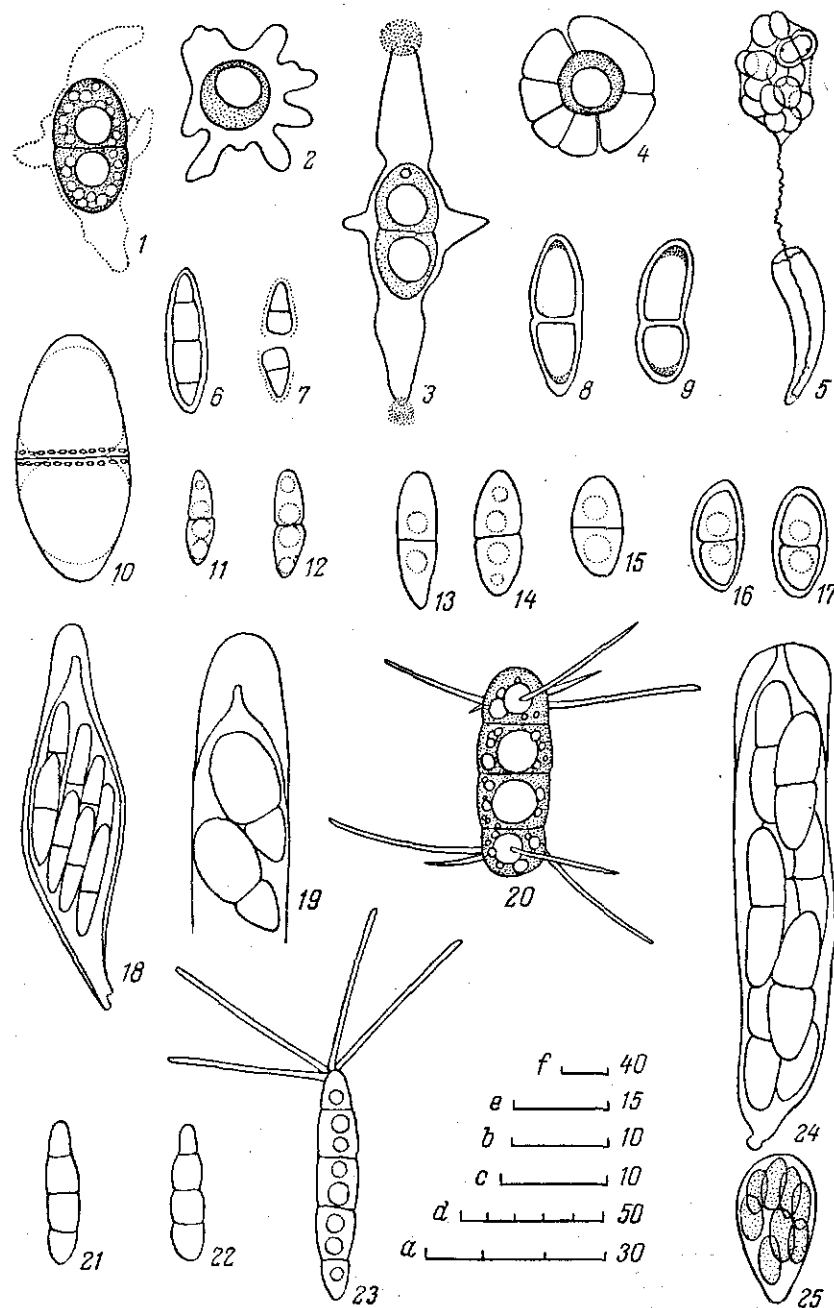
Некоторые морские сумчатые и несовершенные грибы-сапрофиты образуют перитеции и пикниды в значительной степени погруженные в субстрат — древесину. Для выделения этих грибов в чистую культуру предлагается следующий метод. Из панели стерильным ланцетом вырезают маленький блок древесины (не более 4 мм²), содержащий единственный перитеций или пикниду гриба. Поверхность блока стерилизуют, погружая его на 1.5 мин. в 50%-й раствор перекиси водорода. Затем блок промывают в пяти сменах стерильной морской воды, помещают на сухое стерильное предмостное стекло и тщательно раздробляют на мелкие кусочки стерильными препаровальными иглами, освобождая тем самым плодотворение гриба от окружающей его древесины. Дальнейшая процедура совпадает с вышеизложенной, т. е. плодородное тело протыкают стерильной иглой и выходящую массу спор высевают на агаризованную среду.

Метод погружения блоков и панелей древесины различных пород в качестве приманки для обнаружения встречающихся в морской воде сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов с последующим выделением этих грибов в чистую культуру на различных питательных средах является весьма распространенным в настоящее время и применяется многими исследователями, изучающими микофлору океанов, морей и эстуариев (Johnson, 1956; Meyers, 1957; Meyers, Reynolds, 1958, 1959, 1960; Johnson et al., 1959; Moore, Meyers, 1959; Kohlmeyer, 1960, 1963, 1964, 1968a, 1968b, 1968c; Johnson, Sparrow, 1961; Jones, 1962; Sgueros et al., 1962; Anastasiou, 1963; Jones, Jennings, 1964; Jones, Oliver, 1964; Meyers, Simms, 1965; Kohlmeyer J., E. Kohlmeyer, 1966; Meyers, Hoyo, 1966; Tubaki, 1966, 1967, 1968, 1969; Meyers, Scott, 1967; Cava-

Рис. 21. Роды *Halosphaeria*, *Melanopsamma*, *Didymella*, *Massariella*, *Mycosphaerella*, *Stigmatella*, *Metasphaeria*, *Torpedospora*, *Amphisphaeria*, *Physalospora*, *Pharacidia*, *Lignicola*.

1, 2 — *Halosphaeria circumvestita*: 1 — зрелая двуклеточная аскоспора с неправильными слизевидными отростками; 2 — аскоспора в поперечном разрезе; 3, 4 — *Halosphaeria tubulifera*: 3 — зрелая двуклеточная аскоспора с крупными трубковидными терминальными отростками; 4 — аскоспора в поперечном разрезе; 5 — *Melanopsamma tregoubovii*, сумка, освобождающаяся от аскоспор; 6, 7 — *Pharacidia pelvetiae*: 6 — зрелая четырехклеточная аскоспора; 7 — части аскоспор; 8, 9 — *Melanopsamma cystophorae*, двуклеточные аскоспоры; 10 — *Melanopsamma* sp., аскоспора; 11, 12 — *Didymella magnae*, двуклеточные аскоспоры; 13—15 — *Lignicola laevis*, двуклеточные аскоспоры; 16, 17 — *Massariella maritima*, двуклеточные аскоспоры в слизистой (студенистой) оболочке; 18 — *Mycosphaerella pelvetiae*, толстостенная сумка с двуклеточными аскоспорами; 19 — *Stigmatella pelvetiae*, толстостенная сумка (верхняя часть) и двуклеточные аскоспоры; 20 — *Torpedospora ambisporosa*, четырехклеточная аскоспора с многочисленными каплями и субтерминальными отростками; 21, 22 — *Metasphaeria australiensis*, четырехклеточные аскоспоры; 23 — *Torpedospora radiata*, пятиклеточная аскоспора с пучком отростков на одном конце; 24 — *Amphisphaeria maritima*, сумка с двуклеточными аскоспорами и заметным капальцем на вершине и маленьким сосочком у основания; 25 — *Physalospora corallinarum*, сумка с одноклеточными аскоспорами.

Масштаб (в мкм): а — 13—15, 18, 19, 21—23; б — 6, 7, 10—12, 16, 17; с — 20; д — 8, 9, 24, 25; е — 1—4; ф — 5.



liere, 1968; Hughes, 1968; Kirk, 1969a, 1969b, и др.). С помощью этого метода в исследованных океанах, морях и эстуариях были обнаружены многочисленные представители аскомицетов из родов *Antennospora*, *Corollospora*, *Gnomonia*, *Leptosphaeria*, *Lignincola*, *Remispora*, *Sphaerulina*, *Torpedospora*, *Heleococcum*, *Ceriosporopsis*, *Lulworthia*, *Amylocarpus*, *Halosphaeria*, *Lindra*, *Didymosphaeria*, *Amphisphaeria*, *Haloguignardia*, *Peritrichospora*, *Etona*, *Phaeosphaeria*, *Haligena*, *Keissleriella*, *Paraliomyces*, *Ophiobolus* и др., а также представители *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*) из родов *Cirrenalia*, *Clavariopsis*, *Culcitalna*, *Humicola*, *Monodictys*, *Nia* (?), *Papulospora*, *Piricauda*, *Varicosporium*, *Zalerion*, *Diplodia*, *Phoma* и др.

Выделение и получение чистых культур морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов, развивающихся на других приманках. В качестве приманок для обнаружения встречающихся в морской воде сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов кроме панелей и блоков древесины используются также листья различных древесных пород, в частности лавровишни (*Prunus laurocerasus*) и земляничного дерева (*Arbutus menziesii*). Листья отмывают в стерильной воде, заворачивают в алюминиевую фольгу и помещают в стерильные полиэтиленовые бутылки с продольными или округлыми отверстиями в стенках. Эти бутылки затем погружают в открытом море или в зоне прилива-отлива на глубину около 2 м, закрепляя их на нейлоновой веревке, верхний конец которой присоединен к буйку, а нижний закорен. Сосуды с листьями выдерживают в морской воде от 1 до 4 недель. После извлечения листья переносят в стерильную посуду и доставляют в лабораторию, где их в течение 3 дней инкубируют в чашках Петри, наполненных стерильной морской водой. Через 3 дня на листьях появляются плодоношения и колонии сумчатых и несовершенных грибов, из которых производят выделение их на искусственные питательные среды аналогично тому, как производят выделение грибов с панелей древесины (Anastasiou, Churchill, 1969). С помощью листьев в качестве приманки выделены из морской воды сумчатые грибы из родов *Corollospora* и *Lulworthia*, несовершенные грибы из родов *Alternaria*, *Cylindrocarpon*,

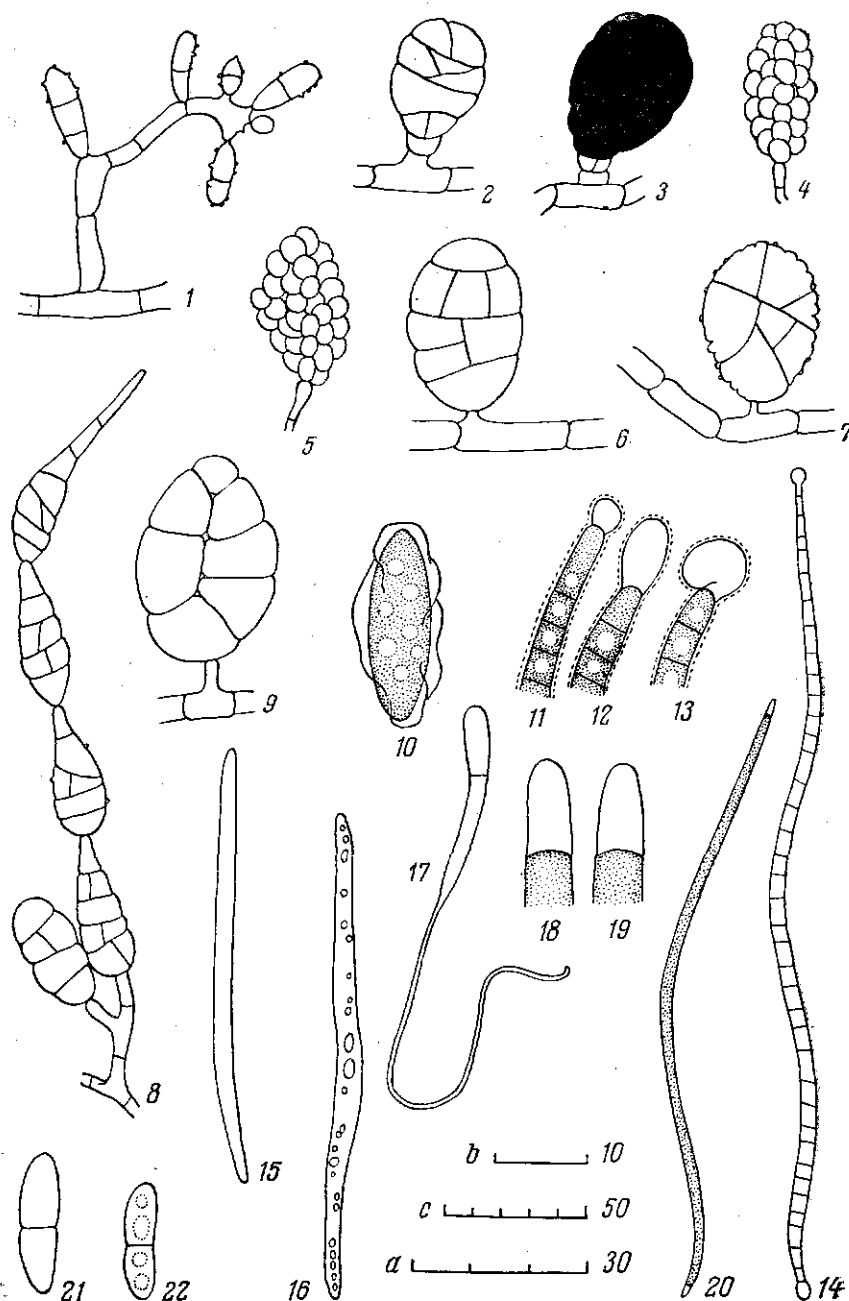


Рис. 22. Несовершенные и сумчатые грибы, обнаруженные в морских водоемах (роды *Dendryphiella*, *Dictyosporium*, *Stemphylium*, *Alternaria*, *Samarosporella*, *Lindra*, *Ophiobolus*, *Trallia*, *Lulworthia*, *Hypoderma*, *Maireomyces*, *Piricauda*).

1 — *Dendryphiella arenaria*, бородавчатые конидии и конидиеносец; 2, 3 — *Piricauda pelagica*: 2 — молодая многоклеточная муральная конидия, 3 — зрелая конидия; 4, 5 — *Dictyosporium pelagica*, конидии; 6, 7 — *Stemphylium maritimum*: 6 — конидия с гладкой оболочкой, 7 — конидия с бородавчатой, шероховатой оболочкой; 8 — *Alternaria maritima*, цепочка муральных конидий, верхняя конидия с удлиненным суженным клювом; 9 — *Stemphylium codii*, муральная конидия; 10 — *Samarosporella pelagica*, зрелая аскоспора со слизистой оболочкой; 11—14 — *Lindra inflata*: 11—13 — формы развивающихся аскоспор, 14 — зрелая нитевидная многоклеточная аскоспора; 15 — *Ophiobolus australiensis*, аскоспора; 16 — *Maireomyces peysonelliae*, аскоспора; 17 — *Trallia ascophylli*, аскоспора; 18—20 — *Lulworthia submersa*: 18, 19 — верхушки аскоспор, 20 — зрелая нитевидная аскоспора; 21, 22 — *Hypoderma laminariae*, двуклеточные споры. Масштаб (в мкм): а — 1—7, 9, 11—13, 17, 21, 22; б — 10, 18, 19; с — 8, 14—16, 20.

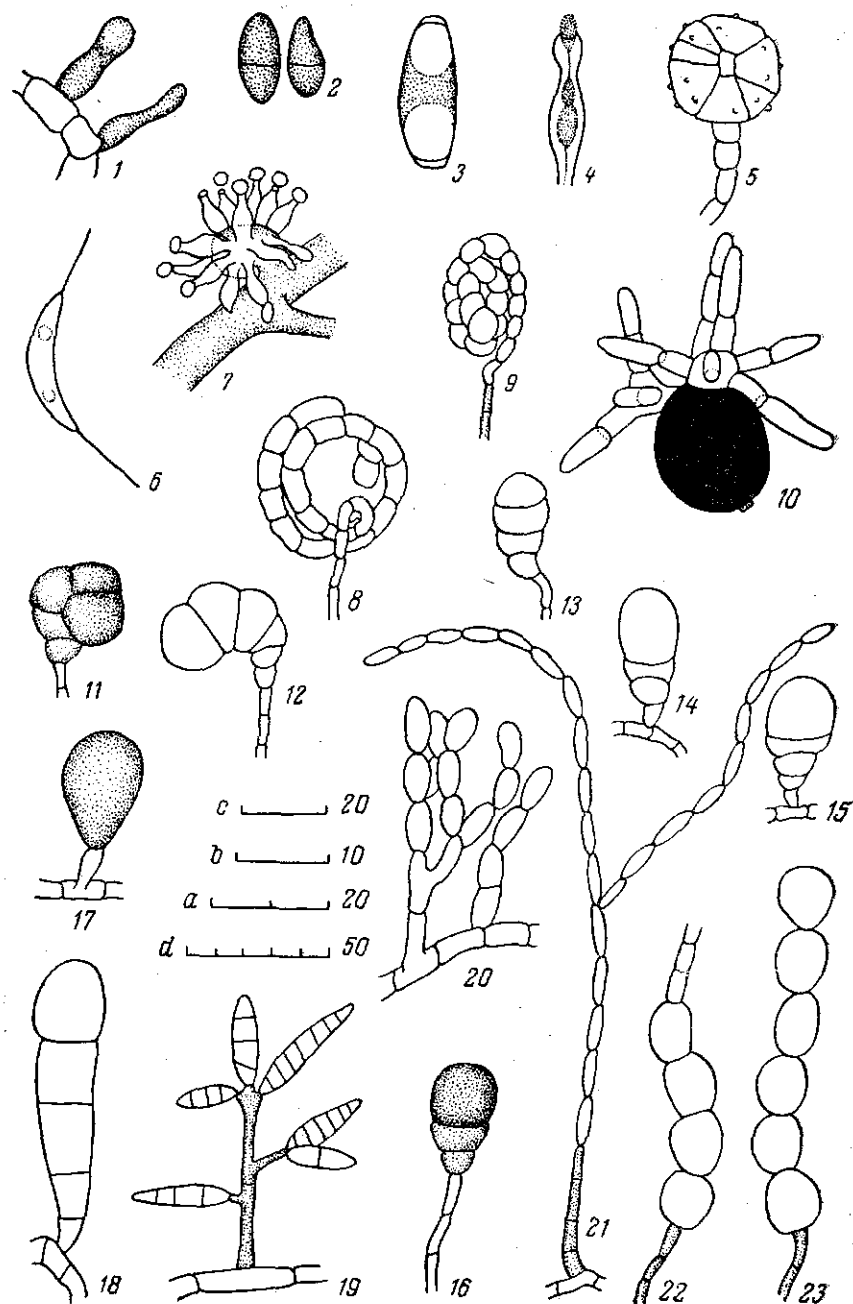
Dictyosporium, *Humicola*, *Monodictys*, *Papulospora*, *Sporotrichum*, *Zalerion* и др.

Выделение и получение чистых культур сумчатых и несовершенных грибов, развивающихся на морских водорослях-макрофитах и высших растениях. Сумчатые и несовершенные грибы-сапрофиты встречаются в морях и океанах не только на таких специфических субстратах, как погруженная древесина и листья древесных пород, но довольно обильно представлены в донных илах, грунтах и отложениях, реже в морской воде, а также обнаруживаются на поверхности водорослей-макрофитов и высших растений. Некоторые представители последней группы не являются истинными сапрофитами, а скорее могут быть отнесены к факультативным паразитам, т. е. обычно они живут сапрофитно, но нередко при особых условиях могут перейти к паразитизму. Согласно данным Кольмейера (Kohlmeier, 1963), эти грибы образуют с водорослью или высшим растением, на котором они обитают, своеобразную симбиотическую ассоциацию. Учитывая тот факт, что для грибов этой группы сапрофитный образ жизни является более характерным, чем паразитический, а также тот факт, что у них отсутствует тесная связь с водорослью как субстратом, имеющая место в случаях облигатного паразитизма, методы сбора и выделения этих грибов в чистую культуру рассматриваются в разделе, посвященном методам исследования сапрофитных морских грибов (стр. 92, 103).

Для сбора и выделения сумчатых и несовершенных грибов, развивающихся на поверхности талломов морских водорослей-макрофитов и на поверхности высших морских растений, применяется метод непосредственного сбора вышеуказанных субстратов, таких как водоросли *Sargassum*, *Ascophyllum*, *Fucus*, *Laminaria*, *Lithophyllum*, *Cystoseira*, *Epilithon*, *Ballia* и мн. др., высшие травянистые растения *Zostera*, *Thalassia*, *Juncus*, *Posidonia*, *Spartina* и др., и корни, ризофоры, пневматофоры древесных растений мангровых зарослей *Rhizophora*, *Avicennia*, *Mangifera* и др., которые в нижней своей части постоянно погружены в морскую воду.

Рис. 23. Несовершенные грибы, обнаруженные в морских водоемах и эстуариях (роды *Diplodia*, *Phialophorophoma*, *Epicoccum*, *Dinemasporium*, *Botryophialophora*, *Helicoma*, *Cirrenalia*, *Culcitaina*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Cremasteria*, *Orbimyces*, *Macrophoma*, *Humicola*, *Fusidium*).

1, 2 — *Diplodia orae-marit*: 1 — конидиеносцы, 2 — двуклеточные конидии; 3 — *Macrophoma gymnogongri*, конидия; 4 — *Phialophorophoma littoralis*, фиалида с эндоконидией; 5 — *Epicoccum maritimum*, конидия; 6 — *Dinemasporium marinum*, конидии со щетинками; 7 — *Botryophialophora marina*, бутылевидные фиалиды, образовавшиеся на плетевотенно расположенной клетке; 8 — *Helicoma salinum*, конидия; 9 — *Helicoma maritimum*, конидия; 10 — *Orbimyces spectabilis*, конидия с базальными клетками и верхушечными септированными отростками; 11, 12 — *Cirrenalia macrocephala*, верхушечная изогнутая конидия; 13—16 — *Culcitaina* (*Trichocladium*) *achraspora*, септированные конидии; 17, 18 — *Humicola alopallionella*: 17 — верхушечная конидия на одноклеточном конидиеносце, 18 — верхушечная конидия на удлиненном четырехклеточном конидиеносце; 19 — *Cercospora salina*, конидиеносец и многоклеточные конидии; 20 — *Cladosporium algarum*, конидии в цепочках на коротком боковом конидиеносце; 21 — *Fusidium maritimum*, простой четырехклеточный конидиеносец и длинные цепочки конидий; 22, 23 — *Cremasteria sumatilis*: 22 — интеркалярная цепочка конидий, 23 — верхушечная цепочка конидий. Масштаб (в мкм): а — 5, 7, 11—18, 20, 22, 23; б — 1—4, 6; с — 10; д — 8, 9, 19, 21.



Наиболее разработаны в настоящее время методы исследования сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов, развивающихся на водорослях. Эти грибы многими исследователями даже выделяются в самостоятельную, так называемую «водорослевую» группу (algicolous или phycophilous group — Kohlmeyer, 1967, 1968d, 1969b, 1969c; Kohlmeyer et al., 1967; Tubaki, 1969) в отличие от грибов, развивающихся на погруженной древесине (lignicolous group — Tubaki, 1969, и др.).

Для сбора водорослей, которые являются субстратом грибов «водорослевой» группы, используются драги (Алим, 1962), а на небольших глубинах (до 10 м) их достают путем непосредственного погружения с трубкой и маской для подводного плавания (Артемчук, 1968). Во всех случаях полученный материал микроскопируют для выявления представителей микологической флоры. Для этой цели наиболее пригоден следующий способ. Собранные талломы водорослей, содержащие плодоношения грибов, замораживают, а затем хранят в холодильнике столько, сколько это необходимо. Плодовые тела, а также колонии грибов, имеющиеся на этих водорослях, не претерпевают значительных морфологических изменений при замораживании (Kohlmeyer, 1968d). Срезы плодовых тел сумчатых и несовершенных грибов производятся микротомом при 15°. Для выявления слизистых отростков у аскоспор и для исследования структуры сумок материал окрашивают кислым фуксином, анилиновым голубым, хлопковым синим, гематоксилином или виоламином. По данным Кольмейера (Kohlmeyer, 1968d), вполне пригодны для микроскопического исследования также талломы водорослей с плодовыми телами грибов, зафиксированные в формалине, и даже гербарные образцы этих талломов.

Для выделения чистых культур сумчатых и несовершенных морских грибов, развивающихся на водорослях, предлагается несколько способов обработки материала. Кусочки таллома водорослей по одному способу инкубируют в чашках Петри на стерильной фильтровальной бумаге при комнатной температуре в течение трех недель (Tubaki, 1969). По истечении этого срока непосредственно на водоросли и на окружающей стерильной фильтровальной бумаге появляются плодоношения грибов. По второму способу кусочки водорослевых талломов раскладывают в чашках Петри, дно которых едва прикрыто слоем стерильной морской воды, так что водоросли частично приподнимаются над уровнем воды. Эти чашки с водорослями инкубируют при комнатной температуре в течение нескольких недель (Kohlmeyer, 1966). Через две недели на кусочках талломов появляются плодоношения грибов. По третьему способу кусочки талломов водорослей помещают на поверхности различных агаризованных питательных сред в чашках Петри и инкубируют при разных температурах — от 5 до 20° (Sparrow, 1937; Артемчук, 1968). В зависимости от температуры, при которой производилась инкубация, через определенное время (от суток до нескольких дней) на поверхности сред появляются ко-

лонии грибов, иногда содержащие плодоношения. Во всех этих случаях полученные исходные культуры грибов вполне пригодны для выделения из них чистых культур, которое производится общепринятыми методами.

Вышеизложенные методы были использованы для обнаружения на талломах водорослей и для выделения в чистую культуру ряда видов грибов, в том числе из *Ascomycetes* представителей родов *Didymella*, *Mycosphaerella*, *Orcadia*, *Phycomelaina*, *Trailia*, *Lindra*, *Corollospora*, *Thalassoascus*, *Mycophycophila*, *Lulworthia*, *Spathulospora* и др., и из *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*) представителей родов *Macrosporium*, *Varicosporina* и др.

Выделение и получение чистых культур грибов, развивающихся на морских высших растениях. Весьма сходны с методами сбора и выделения в чистую культуру сумчатых и несовершенных грибов, развивающихся в основном сапрофитно на водорослях-макрофитах, методы сбора и выделения грибов этих групп, развивающихся на различных органах высших морских растений, как травянистых, так и древесных. Сбор травянистых морских растений производится драгами или же путем непосредственного погружения. Полученный материал сразу же микроскопируется для выявления плодовых тел и спороносящих колоний сумчатых и несовершенных морских грибов. Большинство грибов этой группы достаточно хорошо обнаруживается методом непосредственного микроскопирования растительных субстратов. Особенно это относится к сумчатым и несовершенным морским грибам-сапрофитам, развивающимся на погруженных в воду частях мангровых деревьев *Rhizophora* и *Avicennia*. Их корни и пневматофоры, постоянно находящиеся в морской воде, выполняют роль своеобразных приманок для целого ряда сумчатых и несовершенных грибов (Kohlmeyer, 1968c, 1969b). Путем непосредственного микроскопирования этих частей мангровых деревьев, извлеченных из воды, обнаружены многочисленные сумчатые грибы из родов *Didymosphaeria*, *Haligena*, *Halosphaeria*, *Keissleriella*, *Lulworthia*, *Mycosphaerella*, *Paraliomyces*, *Torpedospora*, *Heliascus*, *Lignincola*, *Metasphaeria*, *Hydronectria*, *Trematosphaeria*, а также некоторые представители несовершенных грибов из родов *Cytospora*, *Halocyphina*, *Phoma*, *Robillarda*, *Cirrenalia*, *Clavariopsis*, *Culcitalna*.

Травянистые растения также сразу же после извлечения подвергают микроскопическому исследованию. В результате прямого микроскопирования на некоторых из них также были обнаружены представители сумчатых и несовершенных грибов. Так, на некротических пятнах листьев черепашьяй травы (*Thalassia testudinum*) был выявлен аскомицет *Lindra thalassiae*, а на листьях зостеры морской (*Zostera marina*) и той же черепашьяй травы был выявлен несовершенный гифальный гриб *Varicosporina ramulosa* (Meyers, Kohlmeyer, 1965). Для более полного установления видового состава сумчатых и несовершенных грибов части высших растений нередко инкубируют по методу Кольмейера (Kohlmeyer,

1966), т. е. помещают их в чашки Петри с незначительным количеством стерильной морской воды и содержат эти чашки при комнатной температуре в течение нескольких недель. На листьях и ризомах некоторых морских растений, в частности zostеры, были обнаружены перитеции сумчатого гриба *Corollospora maritima*, пикниды несовершенного гриба *Phoma* и колонии несовершенных грибов *Varicosporina ramulosa* и *Alternaria* sp. (Kohlmeyer, 1966).

Получение чистых культур несовершенных грибов-сапрофитов из толщи воды, пены, илов и грунтов. Для сбора и выделения в чистую культуру грибов-сапрофитов из морской воды и илов, в основном плесневых и других несовершенных грибов, применяется метод отбора водных проб и проб грунта. Для этого используются различные батометры, как гидрологические, так и микробиологические (Крисс, 1959; Крисс и др., 1964; Артемчук, 1968). Наиболее подходящими для целей микологического исследования океанических и морских вод являются пробоотборник Нискина и батометр Хансена. Грунт с небольших глубин поднимается драгой (Johnson, 1956) или же пробоотборником Снаппера (Tubaki, 1969), а с более глубоких участков дночерпателем (до глубины 500 м) или же геологической трубкой Пратге со сменным вставным медным цилиндром (Артемчук, 1968). Все пробы воды и ила из пробоотборников сразу же после их извлечения переносят в стерильную посуду. Обработку проб следует начинать сразу же после их извлечения, не позже чем через 2 часа.

Для выделения грибов из проб воды в чистую культуру используется метод фильтрации этих проб через различные фильтры: мембранные фильтры, целлюлозные мембраны с порами 0.45 мкм (Крисс, 1959; Ruth et al., 1964) и др. При фильтрации 50 мл и более воды на фильтре оседают грибные споры, имеющиеся в морской воде в очень незначительных количествах. Наиболее удобным является применение целлюлозных мембран, которые вместе с задержавшимися на них в процессе фильтрации грибными зародышами переносят на чашку Петри с агаризованной питательной средой. Через несколько суток на фильтрах развиваются грибные колонии.

Наряду с методом фильтров для сбора и выделения грибов из морской воды может быть использован также метод приманок, в качестве которых рекомендуются губки, изготовленные из целлюлозы (Ruth et al., 1964). Целлюлозные губки при помощи медных винтиков прикрепляют с обеих сторон прямоугольного деревянного блока, стерилизуют в автоклаве, привязывают к нейлоновой веревке и погружают на 2—3 недели в море на исследуемом участке. Нижний конец веревки закорен, верхний прикреплен к поплавку. После извлечения из морской воды губки помещают в стерильную морскую воду до полной их гомогенизации, после чего высевают на различные питательные среды. Целлюлозные губки в качестве приманок используют для изучения плесневых

грибов в воде сравнительно неглубоких прибрежных участков морей и океанов.

Для выделения грибов из морских илов предлагается следующий метод (Tubaki, 1969). Пробы ила в простерилизованных полиэтиленовых сосудах с закручивающимися пробками, в которые их переносят из пробоотборников, сразу же после отбора помещают в холодильник и хранят при 4—5°. При обработке этих проб по 2.5 г ила из каждой пробы переносят в пробирки с 5 мл стерильной морской воды; из полученной суспензии отбирают 0.5 мл и разводят в воде в отношении 1 : 10; 0.3 мл разведенной суспензии служат инокулюмом при посеве на питательную среду. Так как посев разведенной суспензией ила часто дает незначительную популяцию грибов, иногда на чашки с агаризованной средой мазком высевают непосредственно 0.3 г ила.

С помощью вышеописанных методов из морской воды и илов были выделены многочисленные представители *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*), относящиеся к родам *Penicillium*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Geotrichum*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Dendryphiella*, *Hormodendrum*, *Curvularia*, *Helminthosporium*, *Gonatotryum*, *Aureobasidium* (пор. *Moniliales*), *Diplodia*, *Robillarda*, *Phoma* (пор. *Sphaeropsidales*) и др. Эти методы пригодны также для выделения из морской воды микроскопических грибов пор. *Mucorales* (*Phycomycetes*).

Из выделенных грибов только несколько видов, в первую очередь *Aureobasidium pullulans* и *Dendryphiella arenaria*, являются типичными морскими обитателями.

В ряде случаев споры морских сумчатых и конидий морских несовершенных грибов могут быть обнаружены в морской воде путем непосредственного микроскопирования. Обычно количество грибных спор в морской воде крайне незначительно. Как уже было указано выше, для того чтобы получить положительные результаты при посеве проб морской воды, нужно предварительно при помощи фильтрации добиться существенного повышения концентрации грибных зародышей в пробе. Однако совершенно иная картина наблюдается при микроскопировании морской пены, которая в изобилии образуется в морях и океанах в зоне приливов и отливов. Как известно на примере пресных водоемов, пена благодаря своим физико-химическим свойствам, в первую очередь поверхностному натяжению, является прекрасной ловушкой для грибных спор, в частности для конидий водных гифомицетов. Апатична роль пены и в море. Во время сильных штормов волны выбрасывают на берег большое количество пены. Сбор морской пены производится специальными мешочками из плотного пластика 20 × 23 см. Когда мешок наполняется пеной наполовину, ее переливают в бутылку, а ненужную воду сливают. Если пена бедна органическим веществом, то пузырьки ее быстро лопаются и остается вода, которую после некоторого периода отстаивания (несколько часов в холодильнике при 5—10°) можно микроскопировать. Со-

держание отстаивающихся проб при низких температурах необходимо, так как оно препятствует прорастанию грибных спор. Отстоявшиеся пробы обрабатывают следующим образом: осторожно, чтобы не взмутить осадок, удаляют лишнюю воду, затем пипеткой часть осадка переносят на предметное стекло и, покрыв каплю покровным стеклом, микроскопируют при увеличении от 150 до 300, лучше в темном поле (Kohlmeyer, 1966, 1967, 1969b). Из каждой пробы пены готовят пять препаратов; каждый препарат просматривают по ширине предметного стекла на 10 участках для получения максимально точных данных о количестве и разнообразии грибных спор. Если не представляется возможности немедленно просмотреть собранные пробы пены под микроскопом, их фиксируют спиртом.

Микроскопирование морской пены позволило выявить ряд морских сумчатых грибов — представителей родов *Corollospora*, *Leptosphaeria*, *Lignincola*, *Metasphaeria*, *Pleospora*, а также конидии ряда видов морских несовершенных грибов из родов *Varicosporina*, *Alternaria*, *Dendryphiella*. Этот метод, однако, еще не нашел достаточно широкого применения при исследовании морских грибов. Несомненно, что дальнейшие работы по изучению видового состава грибных спор морской пены пополнят сведения о грибах, споры которых встречаются в этом своеобразном местообитании.

Подводя итоги обзору методов сбора и выделения в чистую культуру грибов-сапрофитов из классов *Ascomycetes* и *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*) следует подчеркнуть, что наиболее детально эти методы разработаны для представителей так называемой «древесной» группы (lignicolous group), а также грибов, встречающихся в воде и илах, и наименее для грибов «водорослевой» группы (algicolous group) и для грибов, развивающихся на органах высших морских растений. Здесь основным методом является пока непосредственное микроскопирование.

Культивирование морских грибов-сапрофитов из групп сумчатых и несовершенных. Особенности сумчатых и несовершенных морских грибов-сапрофитов, так же как и особенности фикомицетов, заключаются в том, что большинство видов из этих систематических групп грибов в естественной среде обитания приспособилось к существованию при высоких значениях солености воды (до 37‰, а иногда и более).

При составлении питательных сред для выделения и культивирования морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов в первую очередь учитывается именно эта адаптация представителей морской микрофлоры к высокой солености воды. Поэтому в состав сред в обязательном порядке входит минеральная основа, эквивалентная по компонентам морской воде (стр. 103). В большинстве случаев среды для культивирования морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов готовятся на естественной морской воде. Наряду с питательными средами общего характера, которые могут быть использованы

при культивировании почти всех морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов, в процессе исследования питания отдельных представителей этих групп морских грибов разработаны специальные селективные и дифференциальные среды.

П и т а т е л ь н ы е с р е д ы. Одной из наиболее распространенных питательных сред, применяемых как для выделения, так и для массового культивирования сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов, преимущественно развивающихся на погруженной древесине, реже на водорослях и высших растениях, является среда GY. Обычная концентрация компонентов среды GY следующая: глюкоза — 0.1%, дрожжевой экстракт Difco — 0.01%, агар 1.8% на 1 л морской воды. Иногда вышеуказанные компоненты входят в состав среды в несколько иных количествах: глюкоза — 0.5%, дрожжевой экстракт — 0.1%, агар — 1.8% (Ritchie, 1959; Kirk, 1969c); глюкоза — 1.0%, дрожжевой экстракт — 0.1%, агар — 1.5% (Meyers, Reynolds, 1959; Tubaki, 1966). Селективность этой среды для выделения грибов, особенно растущих на погруженных панелях древесины, значительно увеличивается, если соленость морской воды, используемой для приготовления среды, доводится до $\approx 20\text{‰}$ и если к среде добавляется стрептомицин (0.03%). Стрептомицин в указанной концентрации действует как прекрасный ингибитор роста морских бактерий, часто загрязняющих культуры медленнее растущих морских сумчатых и несовершенных грибов. В то же самое время он не подавляет развития этих грибов. Кроме стрептомицина был использован ряд других ингибиторов, в том числе 4.8% KCNS, 0.02% NaN_3 , 0.3% $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, от 0.034 до 0.0034% розового бенгальского, 25—100 активных единиц на 1 мл среды пенициллина; однако все они по разным причинам оказались менее полезными для культивирования морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов, чем стрептомицин.

Грибы указанных групп выращивают на среде GY как в обычных условиях (Meyers, Reynolds, 1959; Ritchie, 1959; Kirk, 1969c) так и на качалках (55 об./мин.) (Meyers, Reynolds, 1959; Sguros et al., 1962; Sguros, Simms, 1963; Meyers, Hoyo, 1966; Meyers, Scott, 1967; Meyers, 1969). Культивирование производится в колбах Эрленмейера (250 мл), содержащих по 50 мл среды GY, или в 125-миллилитровых колбах, содержащих по 25 мл среды, при температуре 25°. В ряде случаев инокуляция жидкой среды GY в колбах Эрленмейера для выращивания гриба на качалке производится специально приготовленным инокулюмом (Sguros et al., 1962; Sguros, Simms, 1963). Изолят гриба извлекается из пробирки с поверхности скошенного агара GY стерильной морской водой. Одну каплю суспензии спор и мицелия затем наносят в центр кольца на поверхности 2%-го агара среды F1003 в чашке Петри (стр. 130). Через 48 час. кольцо удаляют, и мицелий гриба в течение 12 дней растет радиально. На 12-й день часть активно пролиферирующего мицелиального края колонии выра-

закуют и переносят в колбу с 50 мл жидкой среды F1003. После роста гриба на этой среде в течение 1.5 мес. мицелиальную массу гомогенизируют, центрифугируют и дважды отмывают в 80 мл деионизированной воды.

На среде GY были выращены различные представители морских сумчатых и несовершенных грибов, причем не только грибы, развивающиеся на древесине, погруженной в морскую воду, но также грибы, развивающиеся на водорослях и на высших растениях (см. Приложение, табл. 6). В этом смысле среда GY может быть названа универсальной средой для культивирования морских сумчатых и несовершенных грибов. Однако, несмотря на то что среда GY действительно является оптимальной для выращивания грибов этих групп в условиях чистой культуры, первичное выделение, а иногда и дальнейшее культивирование некоторых из них на среде GY весьма затруднено. Вероятно, причинами такого явления могут быть слабый рост облигатных обитателей морской среды на твердых агаризованных субстратах, каким является и агаризованная среда GY, и интенсивное развитие бактерий, «забивающих» рост морских грибов на жидкой среде GY. Для того чтобы облегчить выделение чистых культур этих видов грибов, а также дальнейшее выращивание их на агаризованной среде GY, предлагается следующий прием. Квадраты (1 см²) из прессованной бумажной массы в течение 5 мин. намачивают в глюкозо-дрожжевом бульоне на естественной морской воде (жидкая среда GY). Затем каждый квадрат помещают в сухую чашку Петри и автоклавируют, после чего производят инокуляцию квадрата, нанося споры, конидии или мицелий в центр. Чашки с инокулированными квадратами инкубируют в течение 2—4 недель при 20—25°. Большинство видов грибов из классов *Ascomycetes* и *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*) развивают на поверхности этих квадратов плононошения или образуют воздушный мицелий, которые могут быть использованы для пересева грибов на агаризованную среду GY. После такого промежуточного выращивания на бумажных квадратах, пропитанных жидкой средой GY, все сумчатые и несовершенные морские грибы хорошо растут на твердой среде GY (Johnson et al., 1959).

Кроме среды GY для выращивания чистых культур морских сумчатых и несовершенных грибов используются также некоторые другие среды неопределенного химического состава, в том числе такие широко применяемые для культивирования грибов из разных экологических и систематических групп среды, как картофельно-декстрозный агар (КДА), декстрозо-пептонный агар, среда Чапека, обедненный агар Сабуро и др. (Anastasiou, 1963; Артемчук, 1968). Для культивирования некоторых грибов из этих групп используется вариант среды TG (Emerson, 1941, 1958), в состав которой входят 10.0 г глюкозы и 3.0 г триптона на 1 л морской воды, а также среда, в состав которой входят 1.5% мальц-экстракта на 1 л морской воды (Jones, Jennings, 1964). Довольно

часто грибы из этих групп культивируют на голодном агаре с морской водой (Sgueros et al., 1962; Anastasiou, 1963). Сумчатые и несовершенные грибы, выделенные с погруженных в морскую воду в качестве приманки листьев древесных пород, выращивают на среде Вишняк в модификации Анастасиу и Черчленда (Anastasiou, Churchland, 1969): экстракт печени — 0.02 г, глюкоза — 1.0 г, дрожжевой экстракт — 0.2 г, различные аминокислоты из казеина — 0.1 г, агар — 15.0 г на 1 л профильтрованной стерильной морской воды. При культивировании грибов для подавления бактериального загрязнения к этой среде после ее стерилизации добавляют до 500 тыс. ед. пенициллина и 0.5 г стрептомицина.

Среду для культивирования морских сумчатых и несовершенных грибов предложил и Тубаки (Tubaki, 1969), она включает 30.0 г глюкозы, 1.0 г пептона, 0.5 г MgSO₄·7H₂O, 0.01 г FeSO₄·7H₂O, 1.0 г K₂HPO₄, 0.5 г дрожжевого экстракта, 15.0 г агара и дистиллированную воду до общего объема 1 л. В качестве источника хлора к основной среде поочередно добавлялись NaCl, KCl и MgCl₂, а также смесь этих солей — от 2 до 7%. Более сложный состав имеет среда Провасоли (ASP₂) с естественной или искусственной морской водой (Provasoli et al., 1957), на которой были выращены некоторые сумчатые и несовершенные морские грибы, в основном с погруженной древесины (Meuerys, Reynolds, 1959). В состав этой среды входят 0.1% дрожжевого экстракта или питательный раствор, содержащий 0.04% l-аспарагина, 0.1% NaH-глутамата, 0.1 мг тиамина и 0.5 мкг биотина на 100 мл воды. Кроме того, в состав среды входит 1% глюкозы, которую в ряде случаев заменяют порошковой целлюлозой таких древесных пород, как бальза, осина, сахарный клен, ель, пихта, камедное дерево, береза, желтая сосна. Ни один из сортов древесной пудры предварительно не обрабатывается химически, кроме пудры желтой сосны, из которой хлороформом, бензолом, абсолютным спиртом извлекают смолы и терпены, а затем тщательно промывают пудру горячей и холодной дистиллированной водой.

Таковы те основные среды неопределенного химического состава, которые наряду со средой GY используются для культивирования морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов, развивающихся в основном на погруженной древесине и листьях, реже тех, которые развиваются на водорослях-макрофитах и высших растениях (см. Приложение, табл. 6).

Не все вышеперечисленные среды неопределенного химического состава пригодны для культивирования большинства сумчатых и несовершенных морских грибов. На этих средах не развиваются плодовые тела и спороносные колонии этих грибов. Многие из указанных сред обеспечивают только мицелиальный рост грибов. Между тем для точной идентификации вида, для получения моноспорных штаммов и т. д. необходимы плононосящие и спорообразующие колонии сумчатых и несовершенных морских грибов. В ходе исследований по физиологии питания некоторых

из этих грибов было отмечено значение отдельных компонентов питательной среды как стимуляторов образования плодовых тел — перитециев у представителей класса *Ascomycetes* и микнид у представителей пор. *Sphaeropsidales* и развития спорообразующих колоний у представителей пор. *Moniliales* (*Fungi imperfecti*). На основании этих исследований были разработаны методы стимуляции образования плодовых тел и спорообразующих колоний сумчатыми и несовершенными морскими грибами при выращивании их на искусственных питательных средах. Так, Мейерс (Meyers, 1956) и Рейнольдс и Мейерс (Reynolds, Meyers, 1958) обнаружили, что витамины и аминокислоты положительно влияют на развитие плодоношений морских аскомицетов. Они предложили метод стимуляции образования перитециев у морских аскомицетов путем культивирования изолятов этих грибов на древесине бальзы, пропитанной средой с незначительным содержанием питательных веществ (Johnson et al., 1959). Кирк (Kirk, 1969a) разработал методы стимулирования плодоношений сумчатых грибов более детально. В качестве среды, интенсивно стимулирующей развитие плодоношений у морских аскомицетов, а также весьма удобной для хранения и транспортировки культур этих грибов, Кирк предлагает так называемый березовый агар. Эта среда поддерживает развитие плодоношений по крайней мере у 20 видов морских аскомицетов, причем на березовом агаре способность к плодоношению у аскомицетов сохраняется после 10 и более пересевов, а некоторые виды морских сумчатых грибов на этой среде сохраняли жизнеспособность даже после двухлетнего хранения без пересевов при комнатной температуре. Основой так называемого березового агара является среда следующего состава: 0.3 г дрожжевого экстракта, 10.0 мкг тиамина, 0.5 мкг биотина, 0.02 г янтарной кислоты, 0.2 г KNO_3 , 0.2 г K_2HPO_4 , 1.0 г трис(оксиметил)-аминометана, 18.0 г агара, 1 мл раствора микроэлементов на 1 л естественной морской воды с соленостью 18—20‰. В 1 мл раствора микроэлементов, с 0.5 мг натриевой соли ЭДТА, содержится 10 мкг Mo^{++} (в виде Na_2MoO_4), 1 мг Fe^{+++} , 0.3 мг Zn^{++} , 0.5 мг Mn^{++} и 20 мкг Cu^{++} в виде хлоридов. Агаризованная основная среда по 12—15 мл разливается в специальные пробирки (20×150 мм) с пробками и ей дают застыть в виде скошенного агара. Затем в каждую пробирку со средой асептически вводится стерильная древесина березы (*Betula papyrifera*) в виде двух тонких палочек или палочки для мороженого, которые располагаются на поверхности скошенного агара. Подготовленную таким образом питательную среду инокулируют спорами или мицелием соответствующего вида морского аскомицета, после чего инкубируют в вертикальном положении при комнатной температуре. Следует создать такие условия, чтобы через ватную пробку проникал бы воздух внутрь пробирки. Через три недели после инкубации у большинства видов сумчатых морских грибов, высеванных на эту среду, образуются обильные плодоношения со зрелыми аскоспорами. Боль-

шинство видов морских аскомицетов образует плодоношения внутри агара и на поверхности палочек. Покрытые аскокарпами палочки легко отделяются от среды, фиксируются и, таким образом, они готовы для длительного хранения, для пересылки по почте и т. д.

Для стимуляции образования плодовых тел у некоторых морских сумчатых грибов, которые не развивают плодоношений на березовом агаре, Кирк (Kirk, 1969a) предлагает так называемую бумажную среду. Основная среда, разливаемая в пробирки, состоит из 0.05% дрожжевого экстракта Difco и 1.8% агара на 1 л морской воды. На скошенную поверхность агара в пробирке помещают стерильную полоску ватманской бумаги. После этого среду инокулируют спорами или мицелием соответствующего вида морского сумчатого гриба. Через 2—3 недели инкубации при комнатной температуре на среде и на полоске ватмана образуются аскокарпы. Эта среда является наиболее подходящей для стимулирования образования плодоношений у типично морских сумчатых грибов из родов *Lulworthia* и *Halosphaeria*.

Все изложенные выше методы культивирования, а также описанные питательные среды служат в основном для выделения и выращивания в чистой культуре морских аскомицетов и несовершенных грибов с погруженной древесины, реже с водорослей-макрофитов. Наряду с этими методами, для культивирования морских сумчатых и несовершенных грибов, развивающихся на водорослях и высших растениях, а также встречающихся в толще морской воды и отложениях илов, существуют методы, в которых учтена специфика этих групп грибов.

Некоторые специфические методы существуют для культивирования сумчатых грибов, развивающихся на органах высших растений. Так, культура аскомицета *Lindera thalassiae*, в изобилии развивающегося на некротических листьях черепаховей травы, была получена не только на среде GY, но также и на простерилизованных окисью этилена листьях черепаховей травы. Получение культуры гриба на стерильных листьях черепаховей травы производится следующим образом. Инфицированные листья растения, извлеченного из морской воды, стерилизуют окисью этилена, вырезают из них перитеции гриба и асептически переносят на стерильные предметные стекла с каплей стерильной морской или дистиллированной воды. Тонкой стерильной иглой перитеции разрушают в воде, получая таким образом суспензию аскоспор. С помощью стерильных пастеровских пипеток каплю суспензии наносят на стерильные неинфицированные грибом диски листьев *Thalassia*, помещенные по три в чашки Петри на агаризованную среду соответствующего состава, обычно на агар с морской водой и 0.1% дрожжевого экстракта. После инокуляции чашки заклеивают и инкубируют при 25° в течение 12—14 дней (Meyers, Simms, 1965; Meyers, 1969).

Для культивирования гриба *L. thalassiae* в море отбирают здоровые зеленые листовые пластинки черепаховей травы, и в этот же

день обрабатывают их соответствующим образом и стерилизуют. Листья помещают в сосуд, наполненный морской или дистиллированной водой, и на 20 мин. ставят на качалку. Из отмытых таким образом листьев специальным ножом вырезают диски 3—4 см в диаметре, которые затем вновь отмывают на качалке. После этого диски переносят (в один слой) в чашки Петри и стерилизуют в специальном газовом стерилизаторе (Brown, Fuerst, 1963). Чашки, содержащие стерильные диски листовых пластинок *Thalassia testudinum*, заклеивают специальной лентой и хранят до употребления во влажных камерах, периодически проверяя на соответствующих питательных средах стерильность дисков. Кроме стерилизации дисков в упомянутом газовом стерилизаторе хорошие результаты дает обычная тепловая обработка дисков, т. е. кипячение их в 25 мл стерильной морской воды при 100°.

В чашках Петри с дисками листьев черепашья травы, инокулированными *L. thalassiae*, на 12—14-й день инкубации при 25° на поверхности дисков образуются хорошо развитые, зрелые перитеции гриба.

Для культивирования грибов, выделенных непосредственно из морской воды и илов, которые представлены в основном плесневыми несовершенными грибами, применяются среды, используемые в микологической практике для почвенных грибов: декстрозо-пептонный агар, картофельно-декстрозный агар, среда Чапека, обедненная среда Сабура, солодовый агар (Артемчук, 1968; Tubaki, 1969). Плесневые грибы, выделенные из морской воды, культивируют не только на этих средах, но также на специальной среде с морской водой, в состав которой входят 1% глюкозы, 0.5% пептона, 0.1% дрожжевого экстракта Difco и 1.7% агара. Для подавления роста загрязняющих бактерий к этой среде добавляется 0.05% левомицетина (хлорамфеникол). Целлюлозные фильтры с задержавшимися на них в процессе фильтрации литровой пробы морской воды грибными зародышами переносят на среду вышеуказанного состава в чашках Петри. Чашки с фильтрами затем подвергают 10-дневной инкубации при 20—22°. На 11-й день производят подсчет колоний грибов и пересевают типичные виды на различные микологические среды, приготовленные как на дистиллированной, так и на профильтрованной морской воде (Ruth et al., 1964). Эта среда послужила для выделения из морской воды и культивирования ряда видов плесневых несовершенных грибов (см. Приложение, табл. 6).

Для культивирования грибов, выделенных из морских илов и грунтов, используют большой набор питательных сред, на которых выращивают чистые культуры обычных почвенных грибов. Однако все эти среды готовят на морской воде. Так, Тубаки (Tubaki, 1969) культивировал грибы из морских илов на солодовом агаре с морской водой. Ко всем средам добавляют антибиотики, в частности тетрациклин (50 мкг на 1 мл среды). Инокулированные чашки в течение 7 дней инкубируют при 24°, после чего про-

водят подсчет выросших колоний и идентифицируют грибы. Из морских илов на солодовом агаре были выделены многочисленные виды грибов в основном из *Fungi imperfecti* (см. Приложение, табл. 3).

Помимо питательных сред неопределенного химического состава, которые широко применяются для культивирования морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов, в последние годы для выращивания чистых культур этих грибов разработаны синтетические среды или среды определенного химического состава. Эти среды необходимы для исследования физиологии морских аскомицетов и несовершенных грибов, в том числе для выяснения степени использования грибами различных источников углерода и азота, потребности их в витаминах и установления пределов их солетолерантности.

Довольно распространенной синтетической средой для культивирования морских аскомицетов и несовершенных грибов является среда MS-1 — модифицированная среда Чапека—Докса, в состав которой входят NaNO_3 — 3.0 г, K_2HPO_4 — 1.0 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.001 г, KCl — 0.5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5 г, глюкоза — 10.0 г на 1 л выдержанной отфильтрованной естественной морской воды (Johnson et al., 1959).

Часто применяется также синтетическая среда MS-2 Густафсона и Фриза (Gustafsson, Fries, 1956), незначительно модифицированная Джонсоном и сотрудниками (Johnson et al., 1959), следующего состава: $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ — 1.0 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 2.5 г, KH_2PO_4 — 1.0 г, CaCl_2 — 0.1 г, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 5.5 мг, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 5.5 мг, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 4 мг, лимоннокислое железо — 5.5 мг, лимонная кислота — 5 мг, L-аспарагин — 1.0 г, глюкоза — 10.0 г на 1 л отфильтрованной морской воды.

Джонсон с сотрудниками предложили для выращивания морских сумчатых и несовершенных грибов, в основном развивающихся на погруженной древесине, синтетическую среду MS-4, приготовленную на искусственной морской воде (Johnson et al., 1959). Искусственная морская вода для среды MS-4 приготавливалась согласно прописи Лимана и Флеминга (Lyman, Fleming, 1940). Среда MS-4 состоит из NaCl — 25.0 г, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 10.0 г, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ — 5.0 г, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 2.5 г, KCl — 0.7 г, NaHCO_3 — 0.2 г, H_3BO_3 — 0.003 г, $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0.001 г, KBr — 0.1 г, $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.05 г, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 0.005 г, NaF — 0.005 г, NH_4NO_3 — 0.002 г, глюкоза — 10.0 г на 1 л дистиллированной воды. При необходимости получения агаризованной среды MS-4 добавляется еще 1.8% агара. Среда MS-7 состоит из 10 г порошковой целлюлозы на 1 л морской воды.

Позднее Джонсон (Johnson, Sparrow, 1961) несколько модифицировал эту синтетическую среду: NaCl — 2.0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5%, K_3PO_4 — 0.01%, NH_4NO_3 — 0.02%, $\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.01%, KCl — 0.06%, NaHCO_3 — 0.02%, KBr — 0.01%, NaF — 0.003%, $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0.004%

с добавлением 1 мл раствора микроэлементов, состоящего из натриевой соли ЭДТА — 0.5 мг, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 2.5 мг, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1.0 мг, $MnSO_4 \cdot H_2O$ — 0.5 мг, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ — 0.1 мг, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.05 мг и H_3BO_3 — 0.02 мг. Все эти компоненты среды растворяются в 999 мл дистиллированной воды и вместе составляют искусственную морскую воду. Для получения твердой среды добавляется 1.8% агара. В качестве источника углерода используется глюкоза в количестве 0.5%.

К числу сред, пригодных для культивирования морских аскомицетов и несовершенных грибов, можно отнести упрощенную полусинтетическую среду Мейерса (MS-3) следующего состава: I-аспарагин — 0.4 г, I-глутамин — 0.1 г, тиамин — 0.1 г, NH_4NO_3 — 0.2 г, глюкоза — 10.0 г на 1 л выдержанной отфильтрованной морской воды, а также среды F1003 — F1005 (Sgueros et al., 1962). Среда F1003 и F1003X готовятся на естественной морской воде, среды F1004, F1004X, F1005, F1005X на искусственной морской воде. Эти среды используются в двух вариантах: I вариант (F1003, F1004 и F1005) — содержит в своем составе дрожжевой экстракт (Difco), II вариант (F1003X, F1004X и F1005X) — вместо дрожжевого экстракта вводится K_2HPO_4 . Иногда к среде F1003 и др. добавляют 0.25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (250 мг на 100 мл) и 2% агара.

Компоненты среды	Среды					
	F1003	F1003X	F1004	F1004X	F1005	F1005X
Глюкоза	500 мг	500 мг	500 мг	500 мг	540 мг	540 мг
NH_4NO_3	240 мг	240 мг	240 мг	240 мг	240 мг	240 мг
K_2HPO_4	—	6 мг	—	6 мг	—	6 мг
2-амино-2-(оксиметил)- 1,3-пропандиол (ТНАМ)	121 мг	121 мг	121 мг	121 мг	121 мг	121 мг
Дрожжевой экстракт (Difco)	100 мг	—	—	—	100 мг	—
Естественная морская вода	100 мл	100 мл	50 мл	—	—	—
Искусственная морская вода	—	—	100 мл	100 мл	100 мл	100 мл

Сравнение роста 21 штамма морских аскомицетов и несовершенных грибов, принадлежащих к 14 видам (*Lulworthia grandispora* var. *apiculata*, *L. grandispora* var. *grandispora*, *L. salina*, *L. submersa*, *Antennospora quadricornuta*, *Helicoma macrocephala*, *Torpedospora radiata*, *Lignicola laevis*, *Ceriosporopsis halima*, *Arenariomyces salinus*, *Peritrichospora integra*, *Alternaria maritima*, *Halosphaeriopsis mediosetigera*, *Phoma* sp.), на некоторых средах определенного химического состава (MS-1, MS-2, MS-3 и MS-4) и на некоторых средах химически неопределенного состава (среда GY, голодный агар на морской воде, агар на морской воде с добавлением измельченной в порошок целлюлозы) показывает, что наиболее интенсивный рост всех 14 видов поддерживает среда неопределенного химического состава GY. Синтетические среды, в особенности MS-1 и MS-2, так же как и голодный агар, обеспечивают очень ограниченный рост всех исследованных грибов. При этом все же среда MS-1 поддерживает несколько большее развитие колоний всех 14 видов, чем среда MS-2 (Johnson et al., 1959).

Эти сравнительные исследования еще раз подчеркивают необходимость использования сред обоих типов, как определенного так и неопределенного химического состава для изучения морских сумчатых и несовершенных грибов-сапрофитов. В зависимости от целей и задач, которые ставит перед собой специалист-миколог при исследовании морских грибов этих групп, подбираются и питательные среды для их культивирования. Среда неопределенного химического состава подходит для выделения, массового выращивания и хранения чистых культур морских аскомицетов и несовершенных грибов, а также для более специальных задач — получения плодonoшений, изучения накопления биомассы, предварительного исследования потребностей этих грибов в различных источниках питания. Более глубокое исследование физиологии грибов этих групп требует применения синтетических сред определенного химического состава.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРСКИХ ГРИБОВ-ПАЗАРИТОВ ИЗ КЛАССОВ *PHYCOMYCETES*, *ASCOMYCETES* И *DEUTEROMYCETES* (*FUNGI IMPERFECTI*)

Многочисленные виды морских фикомицетов являются облигатными паразитами водорослей, реже морских животных, в основном беспозвоночных. Облигатно паразитные виды известны среди представителей порядков *Chytridiales* (Sparrow, 1934, 1936, 1960; Feldmann J. et G., 1955; Johnson, 1957; Johnson, Sparrow, 1961, и др.), *Lagenidiales* (Sparrow, 1934, 1936, 1960; Kobayashi, Ookubo, 1953; Feldmann J. et G., 1955; Johnson, 1957; Johnson, Sparrow, 1961, и др.), *Saprolegniales* (Sparrow, 1934, 1960; Aleem, 1950; Bishop, 1950) и др. Основным методом изучения морских фикомицетов — облигатных паразитов — является прямое микроскопирование организма-хозяина, на котором интраматриально или экстрематриально развивается таллом гриба-паразита. В связи с тем, что облигатный паразитизм предполагает узкую специализацию по отношению к субстрату, т. е. к организму-хозяину, то получение чистых культур этих грибов на искусственных питательных средах иногда вообще не удается, а иногда очень затруднено, хотя для выращивания их разработан специальный метод двулученных культур.

Двулученные культуры. В основном этот метод совпадает с методом двулученных культур для пресноводных фикомицетов. Сущность его заключается в том, что на искусственной питательной среде выращивают одновременно и организм-хозяин, и паразитирующий на нем гриб. Поэтому обычно подбирают среду, пригодную в первую очередь для развития организма-хозяина. Так, для полу-

чения чистой культуры фикомицета *Lagenisma coscinodisci*, который является паразитом морской диатомовой водоросли *Coscinodiscus granii*, клетки диатомей, не пораженные грибом, выращивают на обогащенной среде Стоша и Дребе с силикагелем (von Stosch, Drebes, 1964). Водоросль культивируют на твердой среде Стоша и Дребе с антибиотиками (ауреомицин, стрептомицин и неомицин). В состав среды входят такие компоненты: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.278 мг, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0.0989 мг, NaNO_3 — 42.5 мг, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 40.75 мг, натриевая соль ЭДТА — 0.372 мг и $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 15 мг на 1 л морской воды. Силикагель для среды готовят по методу Тейлора (Taylor, 1950) в модификации Гертнер (Gaertner, 1958, 1960): 3 части кремниевой кислоты, 1.2 части 0.1 н. NaOH , 2.5 части концентрированной морской воды (124‰) и 3.3 части дважды дистиллированной воды. Одну клетку водоросли *C. granii* пересевают из колонии, развившейся в иле, на жидкую среду Стоша и Дребе, к которой помимо указанных компонентов добавляют также по 5 мг/л глюкозы, мальтозы и рибозы, 5 мкг/л витамина B_{12} и 0.5 мкг/л биотина. Инфицированные грибом клетки *C. granii* очищают от загрязняющих бактерий и зоофлагеллат обработкой в растворе антибиотиков ауреомицина, стрептомицина и неомицина в течение 24 час. Затем культуру водоросли на жидкой среде Стоша и Дребе инокулируют клетками этой же водоросли с грибом-паразитом, предварительно обработанными антибиотиками (Chakravarty, 1970). Чистые культуры *C. granii*, пораженной *Lagenisma coscinodisci*, поддерживают путем пересева клеток водоросли с грибом-паразитом на свежие культуры не инфицированной грибом диатомовой водоросли. Выращивают чистые культуры *C. granii* с *L. coscinodisci* и без него при 15° и при освещении 800—1000 люкс с ритмом темноты и света по 12 час. в сутки. Для проверки чистоты культур пораженные грибом клетки диатомовой водоросли высевают на среду следующего состава: глюкоза — 3.0 г, мясной экстракт — 3.0 г, дрожжевой экстракт — 1.0 г, пептон — 5.0 г, агар — 15.0 г на 1 л морской воды, инкубируют при 21° и просматривают под микроскопом.

Метод двучленных культур является в настоящее время единственным для выделения и культивирования морских фикомицетов — облигатных паразитов. Среди морских грибов классов *Ascomycetes* и *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*) явление облигатного паразитизма практически отсутствует. Для большинства видов морских аскомицетов и несовершенных грибов, так же как и для ряда видов фикомицетов, которые иногда могут паразитировать на водорослях или беспозвоночных, паразитизм представляет собой явление временное, преходящее, возникающее лишь при определенных условиях. Обычно эти грибы встречаются как сапрофитные, в связи с чем методы их сбора, выделения и культивирования были рассмотрены в числе методов исследования других сапрофитных морских грибов из этих систематических групп (Meyers, Simms, 1965; Fuller et al., 1966; Meyers, 1969, и др.).

Литература к главе II

- Алимов А. А. Морские грибы Белого моря. Бот. журн., 1962, 47 : 1582—1595.
- Артемчук Н. Я. Методы обнаружения микромикетов в морских обитателях. Матер. III Закавказск. конф. по спорным растениям. Тбилиси, 1968 : 92—96.
- Дудка И. А. Основные направления исследования морских грибов из класса *Ascomycetes* и группы несовершенных грибов *Fungi imperfecti*. В кн.: Вопросы морской биологии (Тез. симпозиум молодых ученых АН УССР, Инст. биологии южных морей им. А. О. Ковалевского, Севастополь, 13—16 апр. 1966 г.). Изд. «Наукова думка», Киев, 1966 : 34—37.
- Крисс А. Е. Морская микробиология (глубоководная). Изд. АН СССР, М., 1959.
- Крисс А. Е., Мишустина И. Е., Мицкевич И. Н., Земцова Э. В. Микробное население мирового океана. Видовой состав, географическое распространение. Изд. «Наука», М., 1964.
- Adair E. J., Vishniac H. S. Marine fungus requiring vitamin B_{12} . Science, 1958, 127 : 147—148.
- Aleem A. A. A fungus in *Ectocarpus granulosus* C. Agardh. Nature, 1950, 165 : 119.
- Anastasiou C. J. The genus *Zalerion* Moore et Meyers. Canad. J. Bot., 1963, 41 : 1135—1136.
- Anastasiou C. J., Churchland L. M. Fungi on decaying leaves in marine habitats. Canad. J. Bot., 1969, 47 : 251—257.
- Apstein C. Parasiten von *Calanus finmarchicus*. Wiss. Meeresuntersuch., N. S., 1911, 13 : 205—222.
- Atkins D. On a fungus allied to *Saprolegniaceae* found in the pea-crab *Pinnotheres*. J. Marine Biol. Assoc. U. K., 1929, 16 : 203—219.
- Atkins D. Further notes on a marine member of the *Saprolegniaceae*, *Lepidogonia marina* n. sp., infecting certain invertebrates. J. Marine Biol. Assoc. U. K., 1954a, 33 : 613—625.
- Atkins D. A marine fungus *Plectospira dubia* n. sp. (*Saprolegniaceae*) infecting crustacean eggs and small crustacea. J. Marine Biol. Assoc. U. K., 1954b, 33 : 721—733.
- Atkins D. *Pythium thalassium* sp. nov. infecting the egg-mass of pea-crab, *Pinnotheres pisum*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1955, 38 : 31—46.
- Barghoorn E. S., Linder D. H. Marine fungi: their taxonomy and biology. Farlowia, 1944, 1 : 395—467.
- Belsky M. M., Goldstein S. Effect of fungistatic and bacteriostatic compounds on nonfilamentous marine *Phycomycetes*. Mycol., 1965, 57 : 831—832.
- Bishop M. W. H. Fungoid infection in *Ectocarpus granulosus*. Nature, 1950, 165 : 937.
- Booth T., Miller C. E. Comparative morphological and taxonomical studies in the genus *Thraustochytrium*. Mycol., 1968, 60 : 480—495.

- Brown B. L., Fuerst R. Ethylene oxide sterilization of tissue culture media. Science, 1963, 142 : 1654—1655.
- Cavaliere A. R. Marine fungi of Iceland: a preliminary account of *Ascomycetes*. Mycol., 1968, 60 : 475—479.
- Chakravarty D. K. Production of pure culture of *Lagenisma coscinodisci* Drebe parasitising the marine diatom *Coscinodiscus*. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1970, 12 : 305—312.
- Chesters C. G. C., Apinis A., Turner M. Studies on the decomposition of sea-weeds and sea products by microorganisms. Proc. Linn. Soc. London, 1956, 166 : 87—97.
- Clokie J. Some substrate relationships of the family *Thraustochytriaceae*. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1970, 12 : 329—351.
- Couch J. N. Technique for collection, isolation and culture of chytrids. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1939, 55 : 208—214.
- Couch J. N. A new fungus on crab eggs. J. Elisha Mitchel Sci. Soc., 1942, 58 : 158—162.
- Davis H. C., Loosanoff V. L., Weston W. H., Martin C. A fungus disease in clam and oyster larvae. Science, 1954, 120 : 36—38.
- Elliot J. S. B. The soil fungi of Dovey salt marshes. Ann. Appl. Biol., 1930, 17 : 284—304.
- Emerson R. An experimental study of the life cycle and taxonomy of *Allomyces*. Lloydia, 1941, 4 : 77—144.
- Emerson R. Mycological organization. Mycol., 1958, 50 : 589—621.
- Feldmann J., Feldmann G. Observations sur quelques Phycomycetes marins nouveaux ou peu connus. Rev. mycol., 1953, 20 : 231—251.
- Fell J. N., Ahearn D. G., Meyers S. P., Ruth F. J., Jr. Isolation of yeasts from Biscayne Bay, Florida and adjacent benthic areas. Limnol. Oceanogr., 1960, 5 : 366—376.
- Fuller M. S., Fowles B. E., McLaughlin D. J. Isolation and pure culture study of marine phycomycetes. Mycol., 1964, 56 : 745—756.
- Fuller M. S., Lewis B., Cook P. Occurrence of *Pythium* sp. on marine alga *Porphyra*. Mycol., 1966, 58 : 313—318.
- Fuller M. S., Poytton R. O. A new technique for the isolation of aquatic fungi. Bioscience, 1964, 14 : 45—46.
- Gaertner A. Versuche zur künstlichen Kultur von *Phytophthora infestans* De Bary. Zbl. Bakteriologie. Parasitenkunde, Abt. II, 1958, 111 : 121—122.
- Gaertner A. Einiges zur Ernährungsphysiologie von *Rhizophydium patellarium* Scholz. Arch. Mikrobiol., 1960, 36 : 46—50.
- Gaertner A. Ökologische Untersuchungen an einem marinen Pilze aus dem Umgebung von Helgoland. Helgoländ. Wiss. Meeresuntersuch., 1967a, 15 : 181—192.
- Gaertner A. Niederer mit Pollen köderbarer Pilze in der südlichen Nordsee. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1967b, 10 : 159—165.
- Gaertner A. Eine Methode des quantitativen Nachweises niederer mit Pollen köderbarer Pilze im Meerwasser und im Sediment. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1968a, 3 : 75—92.
- Gaertner A. Die Fluktuation mariner Pilze in der Deutschen Bucht, 1965 und 1966. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1968b, 3 : 105—120.
- Gaertner A. Einiges zur Kultur mariner niederer Pilze. Helgoländ. Wiss. Meeresuntersuch., 1970, 20 : 29—38.
- Galtsoff P. S. Wasting diseases causing mortality of sponges in the West India and Gulf of Mexico. Proc. 8th Amer. Sci. Congr., Washington, 1940 : 411—421.
- Goldstein S. Degradation of pollen by *Phycomycetes*. Ecology, 1960, 41 : 543—545.
- Goldstein S. Development and nutrition of new species of *Thraustochytrium*. Amer. J. Bot., 1963a, 50 : 271—279.
- Goldstein S. Morphological variations and nutritions of a new monocentric marine fungus. Arch. Mikrobiol., 1963b, 45 : 101—110.
- Goldstein S. Studies of a new species of *Thraustochytrium* that displays light stimulated growth. Mycol., 1963c, 55 : 799—811.
- Goldstein S., Belsky M. M. Axenic culture studies of a new marine phycomycete possessing unusual type of asexual reproduction. Amer. J. Bot., 1964, 51 : 72—78.
- Goldstein S., Belsky M. M., Chosak R. Cultivation of a new marine *Dermocystidium* in complex and chemically defined media. Bacteriol. Rev., 1965, 29 : 22.
- Goldstein S., Belsky M. M., Chosak R. Biology of a problematic marine fungus *Dermocystidium* sp. II. Nutrition and respiration. Mycol., 1969, 61 : 468—472.
- Goldstein S., Moriber L. Biology of a problematic marine fungus *Dermocystidium* sp. I. Development and cytology. Arch. Mikrobiol., 1966, 53 : 1—11.
- Grein A., Meyers S. P. The growth characteristics and antibiotic production of *Actinomyces* isolated from littoral sediments and materials suspended in sea-water. J. Bacteriol., 1958, 76 : 457—463.
- Gustafsson U., Fries N. Nutritional requirements of some marine fungi. Physiol. plantarum, 1956, 9 : 462—465.
- Harder R., Ubelmeyer E. Über marine saprophytische *Chytridiales* und einige andere Pilze vom Meeresstrand. Arch. Mikrobiol., 1955, 22 : 87—114.
- Hewatt W. G., Andrews J. D. Oyster mortality studies in Virginia. I. Texas J. Sci., 1954, 6 : 121—123.
- Höhnk W. Studien zur Brack- und Seewassermykologie. I. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1952, 1 : 115—125.
- Höhnk W. Studien zur Brack- und Seewassermykologie. III. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1953, 2 : 52—108.
- Höhnk W. Studien zur Brack- und Seewassermykologie. IV. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1954, 3 : 27—33.
- Höhnk W. Studien zur Brack- und Seewassermykologie. V. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1955, 3 : 199—227.
- Höhnk W. Fortschritte der marinen Mykologie in jüngster Zeit. Naturwiss. Rundschau, 1957, 2 : 39—44.
- Höhnk W., Aleem A. A. Ein Brackwasserpilz: *Olpidium maritimum* nov. sp. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1953, 2 : 224—229.
- Hughes G. C. Intertidal lignicolous fungi from Newfoundland. Canad. J. Bot., 1968, 46 : 1409—1417.
- Hunter A. C. A pink yeast causing spoilage in oyster. Unit. Stat. Depart. Agricult. Bull., 1920, 819 : 1—24.
- Jepson M. W. On the protozoan parasites of *Calanus finmarchicus* in the Clyde sea area. Quart. J. Microscop. Sci., 1937, 79 : 589—658.
- Johnson T. W., Jr. Marine fungi. II. *Ascomycetes* and *Deuteromycetes* from submerged wood. Mycol., 1956, 48 : 841—851.
- Johnson T. W., Jr. Marine fungi. III. *Phycomycetes*. Mycol., 1957, 49 : 392—400.
- Johnson T. W., Jr., Ferchau H. A., Gold H. S. Isolation, culture, growth and nutrition of some lignicolous marine fungi. Phyton, 1959, 12 : 65—80.
- Johnson T. W., Jr., Sparrow F. K., Jr. Fungi in oceans and estuaries. Weinheim, 1961.
- Jones E. B. G. Marine fungi. I. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1962, 45 : 93—114.
- Jones E. B. G., Jennings D. H. The effect of salinity on the growth of marine fungi in comparison with nonmarine species. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1964, 47 : 619—625.
- Jones E. B. G., Oliver A. C. Occurrence of aquatic *Hyphomycetes* on wood submerged in fresh and brackish water. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1964, 47 : 45—48.
- Kirk P. W., Jr. Isolation and culture of lignicolous marine fungi. Mycol., 1969a, 61 : 174—177.

- Kirk P. W., Jr. Aquatic *Hyphomycetes* in wood in an estuary. *Mycol.*, 1969b, 61 : 177—181.
- Kirk P. W., Jr. Fungal growth response to thermal gradient in convection incubators. *Mycol.*, 1969c, 61 : 404—407.
- Kobayashi Y., Ookubo M. Studies on the marine *Phycomycetes*. *Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo*, 1953, 33 : 53—65.
- Kobayashi Y., Tsubaki K., Soneda M. Marine yeasts isolated from little neck clam. *Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo*, 1953, 33 : 47—52.
- Kohlmeyer J. Wood-inhabiting marine fungi from Pacific Northwest and California. *Nova Hedwigia*, 1960, 2 : 293—343.
- Kohlmeyer J. The importance of fungi in the sea. *Sympos. on marine microbiol.*, Springfield, 1963 : 300—314.
- Kohlmeyer J. A new marine Ascomycete from wood. *Mycol.*, 1964, 56 : 770—774.
- Kohlmeyer J. Ecological observations on arenicolous marine fungi. *Zeitschr. allgem. Mikrobiol.*, 1966, 6 : 95—106.
- Kohlmeyer J. Intertidal and phycophilous fungi from Tenerife (Canary Islands). *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 1967, 50 : 137—147.
- Kohlmeyer J. Marine fungi from tropics. *Mycol.*, 1968a, 60 : 252—270.
- Kohlmeyer J. The first Ascomycete from the deep sea. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, 1968b, 84 : 239—241.
- Kohlmeyer J. Dänische Meerespilze (*Ascomycetes*). *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 1968c, 81 : 53—61.
- Kohlmeyer J. Revisions and descriptions of algicolous marine fungi. *Phytopathol. Zeitschr.*, 1968d, 63 : 341—363.
- Kohlmeyer J. A new *Trematosphaeria* from roots of *Rhizophora racemosa*. *Mycopathol. et mycol. appl.*, 1968e, 34 : 1—5.
- Kohlmeyer J. Deterioration of wood by marine fungi in the deep sea. *Mater. performance and the Deep Sea. Amer. Soc. for Testing and Materials Spec. Techn. Publ.*, 1969a, 445 : 20—30.
- Kohlmeyer J. Marine fungi from Hawaii including the new genus *Heliascus*. *Canad. J. Bot.*, 1969b, 47 : 1469—1487.
- Kohlmeyer J. Perithecial hairs with phialides in *Spathulospora phycophila*. *Mycol.*, 1969c, 61 : 1012—1015.
- Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. On the life history of marine *Ascomycetes*: *Halosphaeria mediosetigera* and *H. circumvestita*. *Nova Hedwigia*, 1966, 12 : 189—202.
- Kohlmeyer J., Schmidt I., Nair N. B. Eine neue *Corollospora* (*Ascomycetes*) aus dem Indischen Ozean und der Ostsee. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 1967, 80 : 98—102.
- Lyman J., Fleming R. H. Composition of sea water. *J. Marine Res.*, 1940, 3 : 134—146.
- Meyers S. P. Marine fungi in Biscayne Bay, Florida. *Bull. Marine Sci. Gulf and Caribbean*, 1953, 2 : 590—601.
- Meyers S. P. Taxonomy of marine *Pyrenomycetes*. *Thes. Doct. Dissert.* New York, 1956.
- Meyers S. P. Taxonomy of marine *Pyrenomycetes*. *Mycol.*, 1957, 49 : 475—528.
- Meyers S. P. *Thalassiomycetes*. XI. Further studies of the genus *Lindra* with a description of *L. marinera*, a new species. *Mycol.*, 1969, 61 : 486—495.
- Meyers S. P., Hoyo L. Observations on the growth of the marine hyphomycete *Varicosporina ramulosa*. *Canad. J. Bot.*, 1966, 44 : 1133—1140.
- Meyers S. P., Kohlmeyer J. *Varicosporina ramulosa* gen. nov., sp. nov., an aquatic hyphomycete from marine areas. *Canad. J. Bot.*, 1965, 43 : 915—921.
- Meyers S. P., Reynolds E. S. A wood incubation method for study of lignicolous marine fungi. *Bull. Marine Sci. Gulf and Caribbean*, 1958, 8 : 342—347.
- Meyers S. P., Reynolds E. S. Effects of wood and wood products on perithecial development by lignicolous marine *Ascomycetes*. *Mycol.*, 1959, 51 : 138—145.
- Meyers S. P., Reynolds E. S. Occurrence of lignicolous fungi in Northern Atlantic. *Canad. J. Bot.*, 1960, 38 : 217—226.
- Meyers S. P., Scott E. *Thalassiomycetes*. X. Variation in growth and reproduction of the isolates of *Corollospora maritima*. *Mycol.*, 1967, 59 : 446—455.
- Meyers S. P., Simms J. *Thalassiomycetes*. VI. Comparative growth studies of *Lindra thalassiae* and lignicolous ascomycetes. *Canad. J. Bot.*, 1965, 43 : 379—391.
- Miller C. E. Isolation and pure culture of aquatic *Phycomycetes* by membrane filtration. *Mycol.*, 1967, 59 : 524—527.
- Moore R. T., Meyers S. P. *Thalassiomycetes*. I. Principles of delimitation of the marine mycota with the description of a new aquatically adapted Deuteromycete genus. *Mycol.*, 1959, 51 : 871—876.
- Oppenheimer C. H., Zobel C. The growth and variability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Marine Res.*, 1951, 11 : 10—18.
- Orpurt P. A., Meyers S. P., Boral L. Z., Simms J. *Thalassiomycetes*. V. A new species of *Lindra* from turtle grass *Thalassia testudinum* König. *Bull. Marine Sci. Gulf and Caribbean*, 1964, 14 : 405—417.
- Phaff H. J., Mrak E. M., Williams O. B. Yeasts isolated from shrimps. *Mycol.*, 1952, 44 : 431—451.
- Provasoli L., McLaughlin J. A. A., Drop M. B. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.*, 1957, 25 : 392—428.
- Reynolds E. S., Meyers S. P. Salt water fungi. *Ann. Progr. Report, Office of Naval Research*, 1958 : 1.
- Ritchie D. A fungus flora of the sea. *Science*, 1954, 120 : 578—579.
- Ritchie D. The effect of salinity and temperature on marine and other fungi from various climates. *Bull. Torrey Bot. Club*, 1959, 86 : 367—373.
- Ruth F. J., Jr., Orpurt P. A., Ahearn D. G. Occurrence and distribution of fungi in a subtropical marine environment. *Canad. J. Bot.*, 1964, 42 : 375—383.
- Sgueros P. L., Meyers S. P., Simms J. Role of marine fungi in the biochemistry of the oceans. I. Establishment of quantitative technique for cultivation, growth measurement and production of inocula. *Mycol.*, 1962, 54 : 521—535.
- Sgueros P. L., Simms J. Role of marine fungi in the biochemistry of the oceans. II. Effect of glucose, inorganic nitrogen and tris (hydroxymethyl) aminomethane on growth and pH changes in synthetic media. *Mycol.*, 1963, 55 : 728—741.
- Sparrow F. K. Observations on marine *Phycomycetes* collected in Denmark. *Dansk bot. arkiv*, 1934, 8 : 1—33.
- Sparrow F. K. Biological observations on the marine fungi of Woods Hole waters. *Biol. Bull.*, 1936, 70 : 236—263.
- Sparrow F. K. The occurrence of saprophytic fungi in marine muds. *Biol. Bull.*, 1937, 73 : 242—248.
- Sparrow F. K. *Aquatic Phycomycetes*. 2nd revised ed. Univ. of Michigan Press Ann Arbor, 1960.
- Sparrow F. K., Gotelli D. Is *Atkinsiella holocarpic*? *Mycol.*, 1969, 61 : 199—201.
- Sproston N. G. *Ichtyosporidium hoferi* (Plehn et Muslow, 1911), an internal fungoid parasite of the mackrel. *J. Marine Biol. Assoc. U. K.*, 1944, 26 : 72—98.
- Stosch A. von, Drebes G. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an zentralischen Diatomeen. IV. Die Planktondiatomee *Stephanopyxis turris*, ihre Behandlung und Entwicklungsgeschichte. *Helgoländ. Wiss. Meeresuntersuch.*, 1964, 11 : 209—257.

- Taylor C. B. An improved method for the preparation of silicagel medium for microbiological purposes. J. Gen. Microbiol., 1950, 4 : 235—237.
- Te Starke D. Estuarine distribution and saline tolerance of some *Saprolegniaceae*. Phytol., 1959, 12 : 147—152.
- Tubaki K. Marine fungi from Japan. Lignicolous. I. Trans. Mycol. Soc. Japanese, 1966, 7 : 73—87.
- Tubaki K. An undescribed species of *Heleococcum* from Japan. Trans. Mycol. Soc. Japanese, 1967, 8 : 5—8.
- Tubaki K. Studies on the Japanese marine fungi lignicolous group. II. Publ. Seto Marine Biol. Labor., 1968, 15 : 357—372.
- Tubaki K. Studies on the Japanese marine fungi. Lignicolous group. III. Ann. Report Inst. of Ferment. Osaka, 1969, 4 : 12—41.
- Ulken A. Zwei neue Thraustochytrien aus der Außenweser. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven, 1965, 9 : 289—295.
- Vallin S. Plankton mortality in the northern Baltic caused by a parasitic water moulds. Report. Inst. Freshwater Research Drottningholm, 1951, 32 : 139—148.
- Vishniac H. S. The morphology and nutrition of a new species of *Sirolopidium*. Mycol., 1955a, 47 : 633—645.
- Vishniac H. S. Marine mycology. Trans. N. Y. Acad. Sci., 1955b, 17 : 352—360.
- Vishniac H. S. On the ecology of the lower marine fungi. Biol. Bull., 1956, 111 : 410—414.
- Vishniac H. S. A new marine *Phycomycetes*. Mycol., 1958, 50 : 66—79.
- Vishniac H. S. Salt requirements of marine *Phycomycetes*. Limnol. Oceanogr., 1960, 5 : 362—365.
- Wilson I. M. Notes on some marine fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc., 1951, 34 : 540—543.
- Wilson I. M. Marine fungi: a review of the present position. Proc. Linn. Soc. London, 1960, 171 : 53—70.

Приложение

Таблица 1

СРЕДЫ ДЛЯ ГРИБОВ ПОРЯДКОВ *CHYTRIDIALES* И *HYPHOCHYTRIALES*

Среда Уиффен (Whiffen, 1941b)

NH_4NO_3	0.5 г	Состав солевого раствора:	
Декстроза	2.5 г	K_2HPO_4	0.3 г
Агар-агар	3.0 г	KH_2PO_4	0.2 г
Солевой раствор	500 мл	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 г
pH среды 7.2		NaCl	0.1 г
		$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.01 г
		$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 г
		$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001 г
		Вода дистиллированная	1000 мл

Грибы, выращенные на данной среде: *Cylindrochytridium johnstonii*, *Endochytrium operculatum*, *Entophlyctis* sp., *Nephrochytrium aurantium*, *Nowakowskiella elegans*, *Rhizidiomyces apophysatus*, *Rhizophydium carpophilum*, *Rhizophlyctis rosea*, *Septochytrium variabile*.

Среда Айелло (Ajello, 1948b)

NH_4NO_3	0.5 г	Состав солевого раствора:	
KH_2PO_4	1.5 г	H_3BO_3	5.7 мг
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 г	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	18.6 мг
Декстроза	10.0 г	$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	17.3 мг
Тиамин	0.2 мг	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.1 мг
Солевой раствор	0.5 мг	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	79.0 мг
Вода дистиллированная	1000 мл	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.6 мг
pH среды 5.5		$\text{Ga}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$	6.8 мг
		Вода дистиллированная	100 мл

Гриб, выращенный на данной среде: *Polychytrium aggregatum*.

Среда Хазкина и Уестона (Haskins a. Weston, 1950)

KNO_3	2.0 г	Состав солевого раствора	
(или NH_4NO_3 — 0.8 г)		(см. среду Уиффен; вместо	
Глюкоза	10.0 г	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ используется	
Целлобиоза	5.0 г	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).	
Агар-агар	10.0 г		
Солевой раствор	1000 мл		
pH среды 7.0			

Гриб, выращенный на данной среде: *Karlingia (Rhizophlyctis) rosea*.

Среда Фуллера и Баршада (Fuller a. Barshad, 1960)

K_2HPO_4 (1.0 M)	3 мл	Вода дистиллированная . . .	990 мл
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M)	4 мл	Бромкрезоловый пурпуро-	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 M)	1 мл	вый (0.04%) -й водный рас-	
Глюкоза	5.0 г	твор)	5.0 мл
Аспарагин (Difco)	1.0 г	pH среды 7.0	

Гриб, выращенный на данной среде: *Rhizidiomyces* sp.

Среда Салкин (Salkin, 1970)

KNO_3	$5.6 \cdot 10^{-3}$ (0.056) M (NO_3)	Микроэлементы	
KH_2PO_4	$1.3 \cdot 10^{-4}$ (0.0013) M (PO_4)	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. .	0.8 ppm (Zn)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$4.9 \cdot 10^{-4}$ (0.0049) M (Mg)	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. .	0.81 ppm (Mn)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$5.7 \cdot 10^{-4}$ (0.0057) M (Ca)	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. .	0.24 ppm (Cu)
$\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6) \cdot \text{H}_2\text{O}$	$6.9 \cdot 10^{-6}$ (0.000069) M (Fe)	H_3BO_3	0.05 ppm (B)
Глюкоза	7.5 г	$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. .	0.14 ppm (Mo)
Тиамин	20.0 мкг	Вода дистилли-	
Нитритотриук-		роvanная . . .	1000 мл
сусная кислота	$5.0 \cdot 10^{-4}$ (0.005) M		

Гриб, выращенный на данной среде: *Allochytridium expansens*.

Среда Барр (Barr, 1970a)

K_2HPO_4	0.10% (1.0 г/л)	Микроэлементы	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.050% (0.5 г/л)	Железо лимоннокисл. .	0.1 ppm
Глюкоза	1.00% (10.0 г/л)	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	10.0 ppm
d, l-Аспарагин	0.010% (0.1 г/л)	pH среды 7.0	
Тиамин	0.2 мг/л		

Гриб, выращенный на данной среде: *Hyphochytrium catenoides*.

Таблица 2

СРЕДЫ ДЛЯ ГРИБОВ ПОР. *BLASTOCLADIALES*

Среда Кантино (Cantino, 1948)

В а р и а н т А

Глюкоза	0.3 г	Дрожжевой экстракт (Dif-	
KH_2PO_4	0.14 г	со)	0.1 г
Na_2HPO_4	0.06 г	Бромкрезол	пурпуровый
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02 г	(0.04%-й водный раствор)	0.2 мл
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002 г	Дистиллированная вода	100 мл
		pH среды	5.8—6.4

В а р и а н т Б

Состав тот же, что и у варианта А, но без дрожжевого экстракта, вместо него добавляется триптофан — 0.001 г, 10%-й казеиновый гидролизат (очищенный от витаминов) — 0.5 мл.* и комплекс витаминов: биотин — 1.0 мг и по 10 мг фолиевой кислоты, пиридоксина, никотиновой кислоты, Са-пантотената, аскорбиновой кислоты, рибофлавина, тиамина и *n*-аминобензойной кислоты на 75 мл среды.

Гриб, выращенный на этой среде: *Blastocladia pringsheimii*.

* Гидролизат казеина содержит все важнейшие аминокислоты за исключением триптофана.

Среда Эмерсона и Кантино (Emerson a. Cantino, 1948)

K_2HPO_4	0.1 г	Глюкоза	0.3 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02 г	Дрожжевой экстракт (Dif- co)	0.1 г
NaCl	0.01 г	Дистиллированная вода	100.0 мл
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.01 г		
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.002 г	pH среды 6.5	

Среда Йоу и Каттера (Yaw a. Cutter, 1951)

В а р и а н т m i n i m a l

K_2HPO_4 (М/150)	50 мл	Аспарагин	0.1 г
Na_2HPO_4 (М/150)	50 мл	d, l-Метионин	2.5 мг
MgSO_4	0.05 г	Тиамин	1.0 мкг
Глюкоза	1.0 г		

рН среды 6.8

Гриб, выращенный на данной среде: *Allomyces arbuscula*.

В а р и а н т complete

K_2HPO_4 (М/150)	50 мл	Глюкоза	1.0 г
Na_2HPO_4 (М/150)	50 мл	Аспарагин	0.1 г
MgSO_4	0.05 г	Дрожжевой экстракт (Dif- co)	0.4 г

Среда Барнера и Кантино (Barner a. Cantino, 1952)

K_2HPO_4	0.73 г	Вода дистиллированная	1 л
$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	1.42 г	Глюкоза	1.0 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.20 г	l-Глутаминовая кислота	1.0 г
Микроэлементы (в ppm)		d, l-Метионин	0.04 г
Fe	0.2	Тиамин	20.0 мкг
Mn	0.075	pH среды 7.0	

Грибы, выращенные на данной среде: *Allomyces arbuscula*, *A. anomalous*, *A. cystogenus*, *A. moniliformis*, *A. javanicus* var. *macrogynus*.

Среда Мехлиса (Machlis, 1953b)

K_2HPO_4	0.005 M	$ZnSO_4$	0.1 (Zn)
KH_2PO_4	0.005 M	$CoCl_2$	0.2 (Co)
$(NH_4)_2HPO_4$	0.005 M	$FeCl_3$	1.0 (Fe)
$MgCl_2$	0.0005 M	H_2BO_3	0.5 (B)
$CaCl_2$	0.0005 M	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	0.2 (Mo)
Микроэлементы (в ppm)		Глюкоза	5.0 г/л
$MnCl_2$	0.5 (Mn)	d, l-Метионин	0.1 г/л
$CuSO_4$	0.1 (Cu)	Тиамин	0.15 мг/л
		pH среды 7.0	

Грибы, выращенные на данной среде: *Allomyces javanicus* var. *macrogynus*, *A. arbuscula*.

Среда Ингрехема и Эмерсона (Ingraham a. Emerson, 1954)

	Среда maximum	Среда minimum
K_2HPO_4	0.050%	0.020%
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.10%	0.10%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0250%	0.010%
CaCl_2	0.0010%	0.0010%
Глюкоза	0.50%	0.30%
d, l-Глутаминовая кислота	0.10%	0.10%
d, l-Метионин	0.010%	0.010%
Тиамин	0.15 мг/л	0.15 мг/л
pH среды 7.0		

Грибы, выращенные на данной среде: *Allomyces arbuscula*, *A. anomalous*, *A. cystogenus*, *A. moniliformis*, *A. javanicus* var. *macrogynus*.

Таблица 3

СРЕДЫ ДЛЯ ГРИБОВ ПОР. *SAPROLEGNIALES*

Среда Волконского (Volkonsky, 1933)

K_2HPO_4	0.1 г/л	Аланин	1.0 г/л
MgCl_2	0.1 г/л	Глюкоза	1.0 г/л
FeCl_3	0.01 мг/л (следы)	pH среды 7.0	
Цистин	0.05 г/л		

Грибы, выращенные на данной среде: *Achlya conspicua*, *A. oblongata*, *A. polyandra*, *A. prolifera*, *Aphanomyces* sp., *Dictyuchus monosporus*, *Isoachlya monilifera*, *Saprolegnia parasitica*, *Saprolegnia* sp.

Среда Бхаргавы (Bhargava, 1945a, 1945b)

K_2HPO_4	0.5 г/л	NH_4NO_3	2.0 г/л
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5 г/л	Глюкоза	5.0 г/л
Na_2S	0.17 г/л	pH среды 7.0	

Грибы, выращенные на данной среде: *Achlya* sp., *Brevilegnia gracilis*, *Isoachlya anisospora* var. *indica*, *Saprolegnia delicata*, *S. monoica*.

Среда Уиффен (Whiffen, 1945)

K_2HPO_4 } 0.005 M (до pH 6.0)	CaCl_2	0.001 M
KH_2PO_4 }	Цистин	0.001 M
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Глутаминовая кислота	0.050% (0.5 г/л)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Глюкоза	0.50% (5 г/л)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		

Примечание. Хороший рост грибов также наблюдается при добавлении пептона 0.20%.

Грибы, выращенные на данной среде: *Achlya flagellata*, *Aphanomyces stellatus*, *Dictyuchus monosporus*, *Saprolegnia ferax*, *Thraustotheca clavata*.

Среда Рейшер (Reischer, 1951a, 1951b)

K_2HPO_4 }	0.030%	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2 мг/л
KH_2PO_4 }		$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.0 мг/л
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10%	CoCl_2	0.1 мг/л
NH_4NO_3	0.010%	H_2BO_3	2.0 мг/л
CaCl_2	1.0 мг/л	Глюкоза	1.00%
MnCl_2	4.0 мг/л	NaH-глутамат	0.10%
ZnCl_2	4.0 мг/л	Натриевая соль ЭДТА	0.050%
FeCl_2	0.1 мг/л		
pH среды 4.5—8.6			

Грибы, выращенные на данной среде: *Achlya bisexualis*, *A. colorata*, *A. flagellata*, *A. klebsiana*, *A. racemosa*, *Brevilegnia unispermata*, *Dictyuchus monosporus*, *Isoachlya intermedia*, *Protoachlya paradoxa*, *Saprolegnia delicata*, *Thraustotheca primoachlya*.

Среда Скотта, Пауелла и Сеймура (Scott, Powell a. Seymour, 1963)

K_2HPO_4	0.17 г/л	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0013 г/л
KH_2PO_4	0.14 »	Глюкоза	5.0 »
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 »	NaH-глутамат	2.0 »
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02 »	d, l-Метионин	0.05 »
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.06 »	Натриевая соль ЭДТА	0.5 »
ZnCl_2	0.04 »		
pH среды 7.0			

Грибы, выращенные на данной среде: *Saprolegnia anisosperra*, *S. delicata*, *S. dictina*, *S. ferax*, *S. lapponica*, *S. litoralis*, *S. monoica*, *S. terrestris*.

Среда Анестама (Unestam, 1965)

Na_2HPO_4 } 0.013 M (до pH 6.2)	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.18 мг/л	
NaH_2PO_4 }	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02 »	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01 »	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$			
KCl			
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			
Микроэлементы			
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25 мг/л	Вода дистиллированная	1000.0 мл
H_3BO_3	0.29 »	Глюкоза	6.0 г/л
		Пептон	3.0 »
		Натриевая соль ЭДТА	44 мг/л (или 1.5 мл 0.2 M)
pH среды 6.2			

Примечание. Раствор микроэлементов можно готовить отдельно, для этого надо к 1 л дистиллированной воды добавить $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0.25 г, H_2BO_3 — 0.29 г, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0.18 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.02 г, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0.01 г. Этого раствора брать 1 мл на основную среду в 1000 мл.

Грибы, выращенные на данной среде: *Achlya* sp., *Aphanomyces astaci*, *A. euteiches*, *Dictyuchus* sp., *Saprolegnia* sp., *Thraustotheca* sp.

СРЕДЫ ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ МОРСКИХ ГРИБОВ КЛАССА PHYCOMYCETES

Среда Вишняк (Vishniac, 1960)

NaCl	2.5 г	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.0 мкг
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 г	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.02 г
CaCO ₃	0.02 г	H ₂ SO ₄	Следы
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 мг	Натриевая соль ЭДТА	5.0 мг
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.02 мг	Глюкоза	0.2 г
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 мг	NaH-глутамат	0.2 г
CoSO ₄ ·7H ₂ O	2.0 мкг	Агар-агар	0.1 г
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.2 мкг	Тиамин	1.0 мкг
H ₃ BO ₃	2.0 мкг	Цианкобаламин	0.1 мкг
KCl	0.1 г	Вода дистиллированная	100.0 мл
KH ₂ PO ₄	0.01 г		
NaHCO ₃	0.01 г		

pH среды 7.4

Грибы, выращенные на данной среде: *Thraustochytrium motivum*, *Th. aureum*, *Th. multirudimentale*, *Th. roseum*, *Schizochytrium aggregatum*, *Dermocystidium* sp.

Среда Гольдштейна и Морибера (Goldstein a. Moriber, 1966)

NaCl	2.4 г	K ₂ HPO ₄	43.0 мг
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.8 г	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.09 мг
CaCl ₂	47.0 мг	Натриевая соль ЭДТА	1.0 г
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.19 мг	Глюкоза	0.4 г
ZnCl ₂	0.06 мг	Гидролизат казеина	0.2 г
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1 мг	Агар-агар	0.1 г
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.0 мкг	Тиамин	20.0 мкг
CuCl ₂ ·2H ₂ O	2.0 мкг	Цианкобаламин	0.3 мкг
H ₃ BO ₃	0.2 мг	Вода дистиллированная	100.0 мл
KCl	70.0 мг		

pH среды 7.3

Гриб, выращенный на данной среде: *Dermocystidium* sp.

Среда Гольдштейна, Бельски и Чосака (Goldstein, Belsky a. Chosak, 1969)

NaCl	2.4 г	KH ₂ PO ₄	43.0 мг
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.8 г	Натриевая соль ЭДТА	1.0 мг
CaCl ₂	15.0 мг	Трис(оксиметил)аминометан	0.2 г
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.19 мг	Глюкоза	0.4 г
ZnCl ₂	0.06 мг	NaH-глутамат	0.2 г
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.1 мг	Агар-агар	0.1 г
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.0 мкг	Смесь витаминов	0.1 мг
CuCl ₂ ·2H ₂ O	2.0 мкг	Вода дистиллированная	100.0 мл
H ₃ BO ₃	0.2 мг		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.09 мг		

pH среды 7.2

Примечание. 1 мл смеси витаминов содержит: тиамин — 200 мкг, биотин — 0.5 мкг, цианкобаламин — 0.05 мкг, никотиновая кислота — 100.0 мкг, Са-пантотенат — 100.0 мкг, рибофлавин — 5.0 мкг, пиридоксин — 40.0 мкг, пиридоксамин — 20.0 мкг, *n*-аминобензойная кислота — 10.0 мкг, холин — 500.0 мкг, инозит(инозитол) — 1.0 мг, тимин — 0.8 мг, оротовая кислота — 0.26 мг, фолиевая кислота — 0.2 мкг, фолиевая кислота — 2.5 мкг.

Гриб, выращенный на данной среде: *Dermocystidium* sp.

МОРСКИЕ ГРИБЫ ИЗ КЛАССА PHYCOMYCETES, ВЫРАЩЕННЫЕ НА РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ НЕОПРЕДЕЛЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА

Среда Вишняк

(гидролизат желатин — 1.0 г, экстракт печени — 0.1 г, глюкоза — 1.0 г, витамины группы В на 1 л морской воды)

Грибы, выращенные на данной среде: *Thraustochytrium motivum*, *Th. multirudimentale*.

Выделены грибы из толщи морской воды.

Автор работы: Goldstein, 1963a—1963c.

Среда та же

Гриб, выращенный на данной среде: *Schizochytrium aggregatum*.

Выделен гриб из толщи морской воды.

Авторы работы: Goldstein, Belsky, 1964.

Среда Вишняк в модификации Фуллера

(гидролизат желатин — 1.0 г, экстракт печени — 0.1 г, глюкоза — 1.0 г, дрожжевой экстракт — 0.1 г, агар — 12.0 г на 1 л морской воды).

Грибы, выращенные на данной среде: *Lagenidium callinectes*, *Haliphthoros milfordensis*, *Atkinsiella dubia*.

Выделены грибы из талломов морских водорослей *Chordaria* sp., *Cladophora* sp., *Ectocarpus* sp., *Enteromorpha* sp.

Авторы работы: Fuller, Fowles, McLaughlin, 1964.

Среда та же

Гриб, выращенный на данной среде: *Pythium* sp.

Выделен гриб из талломов морских водорослей *Porphyra schizophylla*, *P. perforata* и *P. lanceolata*.

Авторы работы: Fuller, Lewis, Cook, 1966.

Среда та же

Гриб, выращенный на данной среде: *Atkinsiella dubia*.

Выделен гриб из яиц краба *Paguristes turgidus*.

Авторы работы: Sparrow, Gotelli, 1969.

Среда Буса и Миллера

(гидролизат желатин — 1.0 г, экстракт печени — 0.5 г, глюкоза — 5.0 г, дрожжевой экстракт — 0.5 г, пептон — 1.0 г и агар — 12.0 г на 1 л морской воды)

Грибы, выращенные на данной среде: *Thraustochytrium roseum*, *Th. visurgense*, *Th. motivum*, *Th. aureum*.

Выделены грибы из талломов морских водорослей из родов *Agarum*, *Alaria*, *Ascophyllum*, *Bangia*, *Chondrus*, *Cladophora*, *Dumontia*, *Ectocarpus*, *Enteromorpha*, *Fucus*, *Halosaccion*, *Laminaria*, *Monostroma*, *Polysiphonia*, *Porphyra*, *Rhodomenia*, *Spongomorpha* и *Ulva*, а также с листьев зостеры.

Авторы работы: Booth, Miller, 1968.

**МОРСКИЕ ГРИБЫ ИЗ КЛАССОВ ASCOMYCETES
И DEUTEROMYCETES (FUNGI IMPERFECTI),
ВЫРАЩЕННЫЕ НА РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ
НЕОПРЕДЕЛЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА**

**ГРИБЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПОГРУЖЕННОЙ
В МОРСКУЮ ВОДУ ДРЕВЕСИНЫ**

Среды

1. Среда GY.*
2. Голодный агар (1.8% агара на 1 л морской воды).
3. Среда с порошковой целлюлозой (10.0 г) и агаром (18.0 г) на 1 л морской воды.

Грибы, выращенные на данных средах: *Lulworthia grandispora* var. *apiculata*, *L. grandispora* var. *grandispora*, *L. salina*, *L. submersa*, *Antennospora quadricornuta*, *Helicoma macrocephala*, *Torpedospora radiata*, *Lignicola laevis*, *Ceriosporopsis halima*, *Arenariomyces salinus*, *Peritrichospora integra*, *Alternaria maritima*, *Halosphaeria mediosetigera*, *Phoma* sp.

Выделены грибы из панелей древесины желтой сосны (*Pinus teada*) и тюльпанного дерева (*Laridodendron tulipifera*), погруженных в морскую воду.

Авторы работы: Johnson, Ferchau, Gold, 1959.

Среды

1. Среда GY.
2. Среда ASP₂ (среда Провасоли) (0.1% дрожжевого экстракта или питательный раствор, содержащий 0.04% l-аспарагина, 0.1% NaN-глутамата, 0.1 мг/100 мл тиамина и 0.5 мг/100 мл биотина, 1% глюкозы на 1 л морской воды).
3. Та же среда, но вместо глюкозы в качестве источника углерода в эквивалентных количествах используют древесную пудру бальзы, осины, сахарного клена, ели, пихты и др.

Грибы, выращенные на данных средах: *Lulworthia grandispora*, *L. floridana*, *L. medusa* var. *biscaynia*, *Antennospora quadricornuta*, *Ceriosporopsis halima*, *Lignicola laevis*, *Torpedospora radiata*, *Peritrichospora integra*, *Arenariomyces salinus*.

Выделены грибы из панелей древесины (?), погруженных в морскую воду.

Авторы работы: Meyers, Reynolds, 1959.

Среда GY

Гриб, выращенный на данной среде: *Nia vibrissia* (?).

Выделен из стружки древесины бука (*Fagus*), погруженной в морскую воду.

Авторы работы: Moore, Meyers, 1959.

Дрожжевой бульон

(0.1% дрожжевого экстракта Difco на 1 л морской воды)

Грибы, выращенные на данной среде: *Halosphaeria appendiculata*, *Peritrichospora integra*, *Chaetomium erectum*, *Ch. globosum*, *Leptosphaeria discors*, *L. albopunctata*, *L. orae-maris*, *L. macrosporidium*, *L. pelagica*, *Didymosphaeria*

* В тех случаях, когда не приведен состав среды GY, была использована стандартная немодифицированная среда: 1% глюкозы, 0.1% дрожжевого экстракта (дрожжевой порошок Difco) и 1.8% агара на 1 л морской воды.

spartinae, *Gnomonia salina*, *Ceriosporopsis halima*, *C. hamata*, *Lulworthia floridana*, *L. rufa*, *L. submersa*, *Alternaria maritima*, *Cercospora salina*, *Cirrenalia macrocephala*, *Helicoma maritimum*, *H. salinum*, *Stemphylium maritimum*, *Phoma* sp. и некоторые другие.

[Выделены из панелей древесины бука (*Fagus*) и сосны (*Pinus*), погруженных в морскую воду.

Авторы работы: Jones, 1962.

Среды

1. Среда GY, измененный вариант (1% глюкозы, 0.25% дрожжевого экстракта, 1.8% агара на 1 л морской воды).
2. Среда F1003 (500 мг глюкозы, 240 мг NH₄NO₃, 121 мг 2-амино-2 (оксиметил)-1,3-пропандиола, 100 мг дрожжевого экстракта Difco на 100 мл морской воды).

Гриб, выращенный на данных средах: *Culcitalna achraspora*.
Выделен гриб из древесины (?), погруженной в морскую воду.
Авторы работы: Sgueros, Meyers, Simms, 1962.

Среды

1. Голодный агар (1.8% агара на 1 л морской воды).
2. Среда YpSs (4.0 г дрожжевого экстракта, 15.0 г растворимого крахмала, 1.0 г K₂HPO₄, 0.5 г MgSO₄ и 20.0 г агара на 1 л морской воды).
3. Картофельно-декстрозный агар на морской воде.

Гриб, выращенный на данных средах: *Zalerion varia*.
Выделен гриб из древесины тамарикса (*Tamarix arphylla*), погруженной в морскую воду.

Авторы работы: Anastasiou, 1963.

Среда с глюкозой (10.0 г) и триптоном (3.0 г) на 1 л морской воды

Гриб, выращенный на данной среде: *Dendryphiella salina* (syn. *Cercospora salina*).

Выделен гриб из блоков древесины (?), погруженных в морскую воду.
Авторы работы: Jones, Jennings, 1964.

Среда с мальц-экстрактом (1.5% на 1 л морской воды)

Грибы, выращенные на данной среде: *Ceriosporopsis halima*, *Cremasteria cymatilis*, *Lulworthia floridana*, *L. medusa*, *L. opaca*, *L. purpurea*, *Monodictys pelagica*, *Remispora quadrimis*, *Sporidesmium salinum*, *Corollospora maritima*.

Выделены грибы из блоков древесины (?), погруженных в морскую воду.
Авторы работы: Jones, Jennings, 1964.

Среды

1. Среда GY, измененный вариант (1% глюкозы, 0.25% дрожжевого экстракта, 1.8% агара на 1 л морской воды).
2. Среда F1003, измененный вариант (0.5% глюкозы, 0.1% дрожжевого экстракта, 0.24% NH₄NO₃, 0.25% MgSO₄·7H₂O, 0.121% трис(оксиметил)аминометана на 1 л морской воды).

Грибы, выращенные на данных средах: *Lulworthia floridana*, *Lulworthia* sp., *Halosphaeria mediosetigera*, *Torpedospora radiata*, *Torpedospora* sp.
Выделены грибы из древесины (?), погруженной в морскую воду.
Авторы работы: Meyers, Simms, 1965.

Среды

1. Среда GY того же состава, что в предыдущем варианте.
2. Среда F1003 того же состава, что в предыдущем варианте.
Гриб, выращенный на данных средах: *Orbimycetes spectabilis*.
Выделены грибы из древесины (?), погруженной в морскую воду.
Авторы работы: Me y e r s, H o y o, 1966.

Среда GY того же состава, что в предыдущем варианте

Гриб, выращенный на данной среде: *Corollospora maritima*.
Выделен гриб из панелей древесины балласта (*Ochroma lagopus*), погруженных в морскую воду.
Авторы работы: Me y e r s, S c o t t, 1967.

Среда GY того же состава, что в предыдущем варианте

Грибы, выращенные на данной среде: *Torpedospora radiata*, *Halosphaeria mediosetigera*.
Выделены грибы из древесины (?), погруженной в морскую воду.
Автор работы: K i r k, 1969c.

Среды

1. Среда с дрожжевым экстрактом Difco (0.1%) и агаром (1.8%) на 1 л морской воды.
2. Среда Тубаки (30.0 г глюкозы, 1.0 г пептона, 0.5 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0 г K_2HPO_4 , 0.5 г дрожжевого экстракта, NaCl, KCl и $MgCl_2$ от 2 до 7%, 15.0 г агара на 1 л дистиллированной воды).

Грибы, выращенные на данных средах: *Antennospora quadricornuta*, *Ceriosporopsis halima*, *Corollospora maritima*, *C. trifurcata*, *Gnomonia longirostris*, *Leptosphaeria discors*, *L. orae-maritima*, *Lignicola laevis*, *Remispora galerita*, *R. maritima*, *R. ornata*, *R. quadrimaris*, *Sphaerulina albispiculata*, *Torpedospora radiata*, *Cirrenalia achraspora*, *Dendryphiella salina*, *Humicola alopallionella*, *Monodictys pelagica*, *Nia vibrissia*, *Papulospora halima*, *Zalerion maritima*, *Z. varia* и некоторые другие.

Выделены грибы из панелей древесины балласта (*Ochroma lagopus*), криптомерии (*Cryptomeria japonica*), павловнии (*Paulownia tomentosa*), филостахиса (*Phyllostachys pubescens*) и ели твердой (*Abies firma*), погруженных в морскую воду.

Автор работы: T u b a k i, 1969.

ГРИБЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПОГРУЖЕННЫХ В МОРСКУЮ ВОДУ ЛИСТЬЕВ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД

Среда Вишняк в модификации Анастасиу и Черчленда

(0.02 г экстракта печени Difco, 1.0 г авитаминизированной смеси аминокислот из казеина, 1.0 г глюкозы, 0.2 г дрожжевого экстракта, 15.0 г бактоагара на 1 л морской профильтрованной воды)

Грибы, выращенные на данной среде: *Lulworthia medusa*, *Corollospora maritima*, *Alternaria tenuis*, *Cylindrocarpus* sp., *Dictyosporium pelagica*, *Humicola alopallionella*, *Monodictys pelagica*, *Papulospora halima*, *Sporotrichum maritimum*, *Stachybotrys atra*, *Zalerion maritimum*.

Выделены грибы из листьев лавровишни (*Prunus laurocerasus*) и земляничного дерева (*Arbutus menziesii*), погруженных в морскую воду.
Авторы работы: A n a s t a s i o u, C h u r c h l a n d, 1969.

ГРИБЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ МОРСКИХ ВОДОРΟΣЛЕЙ (МАКРОФИТОВ) И ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Среды

1. Среда с дрожжевым экстрактом (0.1%) и агаром (1.8%) на морской воде. Эта же среда с разложенными на ее поверхности стерильными дисками из листьев черепашной травы.
2. Среда F1003 (0.1% глюкозы, 0.1% дрожжевого экстракта, 0.24% NH_4NO_3 , 0.25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.121% трис(оксиметил)аминометана на 1 л морской воды), измененный вариант.

Гриб, выращенный на данной среде: *Lindra thalassiae*.
Выделен гриб из некротических листьев черепашной травы (*Thalassia testudinum*), извлеченных из морской воды.
Авторы работы: Me y e r, S i m m s, 1965.

Среда GY

(1% глюкозы, 0.25% дрожжевого экстракта и 1.8% агара на 1 л морской воды)

Гриб, выращенный на данной среде: *Varicosporina ramulosa*.
Выделен гриб из листьев zostеры (*Zostera maritima*) и черепашной травы (*Thalassia testudinum*).
Авторы работы: Me y e r s, K o h l m e y e r, 1965.

Среды

1. Среда GY того же состава, что в предыдущем варианте.
2. Среда F1003 (0.5% глюкозы, 0.1% дрожжевого экстракта, 0.24% NH_4NO_3 , 0.25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.121% трис(оксиметил)аминометана на 1 л морской воды).

Гриб, выращенный на данных средах: *Varicosporina ramulosa*.
Выделен гриб из листьев zostеры (*Zostera maritima*) и черепашной травы (*Thalassia testudinum*).
Авторы работы: Me y e r s, H o y o, 1966.

Среда GY (измененный вариант)

(1% глюкозы, 0.1% или 0.25% дрожжевого экстракта Difco и 1.8% агара на 1 л морской воды)

Гриб, выращенный на данной среде: *Corollospora maritima*.
Выделены грибы из листовой пластинки таллома морской водоросли *Macrocystis*.
Авторы работы: Me y e r s, S c o t t, 1967.

Среды

1. Среда GY, измененный вариант (1% глюкозы, 0.25% дрожжевого экстракта и 1.8% агара на 1 л морской воды).
2. Та же среда с разложенными на ее поверхности стерильными дисками из листьев черепашной травы.

Грибы, выращенные на данной среде: *Lindra marinera*, *L. thalassiae*, *Lindra* sp.
Выделены грибы из листьев черепашной травы (*Thalassia testudinum*).
Автор работы: Me y e r s, 1969.

Среда GY того же состава, что и в предыдущем варианте

Гриб, выращенный на данной среде: *Lindra* sp.
Выделен гриб из талломов морской водоросли *Sargassum* sp.
Автор работы: Me y e r s, 1969.

Среды

1. Среда GY.
2. Та же среда, но вместо 1% глюкозы, 1% ламинарина, На-альгината или другого полисахарида.
3. Среда с дрожжевым экстрактом (0.1%) и агаром (1.8%) на морской воде.
4. Голодный агар (1.8% агара на 1 л морской воды).
5. Среда Тубаки (30 г глюкозы, 1.0 г пептона, 0.5 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 г K_2HPO_4 , 0.5 г дрожжевого экстракта, NaCl, KCl и $MgCl_2$ от 2 до 7%, 15 г агара на 1 л дистиллированной воды).

Гриб, выращенный на данных средах: *Lindra thalassiae*.

Выделен гриб из таллома водоросли *Sargassum* sp. из морской воды.

Автор работы: Т у б а к и, 1969.

Среды те же, что что в предыдущем варианте, кроме среды с дрожжевым экстрактом и агаром

Гриб, выращенный на данных средах: *Varicosporina ramulosa*.

Выделен гриб из опавших листьев zostеры (*Zostera maritima*).

Автор работы: Т у б а к и, 1969.

Среды

1. Среда GY.
2. Та же среда с 1% ламинарина вместо 1% глюкозы.
3. Голодный агар (1.8% агара на 1 л морской воды).
4. Среда с мальц-экстрактом.

Гриб, выращенный на этих средах: *Corollospora maritima*.

Выделен гриб из таллома водоросли *Sargassum* sp. из морской воды.

Автор работы: Т у б а к и, 1969.

ГРИБЫ, ВСТРЕЧАЮЩИЕСЯ В МОРСКОЙ ВОДЕ И ИЛАХ

В морской воде

Среды с глюкозой (1.0%), пептоном (0.5%), дрожжевым экстрактом (0.1%) и агаром (1.7%) на 1 л морской воды

Грибы, выращенные на данной среде: *Penicillium citrinum*, *P. cyclopium*, *P. decumbens*, *P. rubrum*, *P. variabile*, *P. thomii*, *P. rolfii*, *P. diversum*, *P. solitum*, *P. cyaneum*, *P. waksmanii*, *P. velutinum* (всего 19 видов), *Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. sulphureus*, *A. fumigatus*, *A. candidus*, *A. oryzae*, *A. ruber*, *A. sydowii*, *A. versicolor* (всего 15 видов), *Scopulariopsis brevicaulis*, *Gliocladium roseum*, *Paecilomyces varioti*, *Trichoderma lignorum*, *Geotrichum candidum*, *Cephalosporium asperum*, *Alternaria* spp., *Cladosporium herbarum*, *C. sphaerospermum*, *Nigrospora oryzae*, *N. sphaerica*, *N. sacchari*, *Dendryphiella arenaria*, *Hormodendrum pallescens*, *Curvularia lunata*, *C. pallescens*, *Helminthosporium sativum*, *Gonatobotryum fuscum*, *Aureobasidium pullulans*, *Humicola grisea*, *Diplodia orae-maritima*, *Robillarda phragmitis*, *Phoma hibernica*, *Epicoccum nigrum*, *Myrothecium verrucaria*, *Pestalotia palmorum*, *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *F. solani* и др. (всего 112 видов).

Авторы работы: R u t h, O g r u n t, A h e a r n, 1964.

В морском иле

Среда — солодовый агар, приготовленный на морской воде

Грибы, выращенные на данной среде: *Emericellopsis humicola*, *E. microspora*, *Talaromyces spiculiporus*, *T. ucrainicus*, *T. vermiculatus*, *Chaetomium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Humicola*, *Monosporium*, *Nigrospora*, *Pachybasidium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotia*, *Sclerotium*, *Trichoderma* (всего 236 штаммов).

Автор работы: Т у б а к и, 1969.

О Г Л А В Л Е Н И Е

	Стр.
Введение	3
Глава I. Исследование грибов, обитающих в пресных водоемах . .	8
Методы исследования пресноводных грибов-сапрофитов	13
Методические указания по сбору, выделению и культивированию грибов-сапрофитов из класса <i>Phycomycetes</i>	13
Грибы порядков <i>Chytridiales</i> и <i>Pyphochytriales</i>	17
Грибы пор. <i>Blastocladales</i>	25
Грибы пор. <i>Monoblepharidales</i>	29
Грибы пор. <i>Saprolegniales</i>	31
Грибы пор. <i>Leptomitales</i>	37
Грибы пор. <i>Peronosporales</i>	43
Методы исследования пресноводных гифомицетов пор. <i>Hyphomycetales</i> из класса <i>Deuteromycetes</i> (<i>Fungi imperfecti</i>)	46
Методы сбора, выделения и культивирования микроскопических грибов из сточных вод и загрязненных стоками пресных водоемов	56
Методы исследования пресноводных грибов-паразитов	60
Методические указания по сбору, выделению и культивированию грибов-паразитов из класса <i>Phycomycetes</i>	60
Грибы пор. <i>Lagenidiales</i>	64
Грибы порядков <i>Chytridiales</i> и <i>Plasmodiophorales</i>	66
Грибы сем. <i>Coelomomycetaceae</i> (пор. <i>Blastocladales</i>)	69
Методические указания по хранению культур водных грибов	70
Литература к главе I	75
Глава II. Исследование грибов, обитающих в соленых (морских) водоемах	91
Методы исследования морских грибов-сапрофитов	92
Методические указания по сбору, выделению и культивированию грибов-сапрофитов из класса <i>Phycomycetes</i>	92
Методические указания по сбору, выделению и культивированию грибов-сапрофитов из классов <i>Ascomycetes</i> и <i>Deuteromycetes</i> (<i>Fungi imperfecti</i>)	105
Методы исследования морских грибов-паразитов из классов <i>Phycomycetes</i> , <i>Ascomycetes</i> и <i>Deuteromycetes</i> (<i>Fungi imperfecti</i>)	131
Литература к главе II	133
Приложение	139

Матвей Абрамович Литвинов
Ирина Александровна Дудка

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ ПРЕСНЫХ
И СОЛЕННЫХ (МОРСКИХ) ВОДОЕМОВ**

*Утверждено к печати
Всесоюзным микробиологическим обществом*

Редактор издательства В. В. Тарнягина
Художник Я. В. Таубвурцель
Технический редактор О. А. Мокеева
Корректоры С. В. Добрянская и
К. С. Фридлянд

Сдано в набор 13/VI 1975 г. Подписано к печати
17/X 1975 г. Формат 60×90¹/₈. Бумага № 2. Печ.
л. 9¹/₂=9.5 усл. печ. л. Уч.-изд. л. 11,63. Изд. № 5884.
Тип. зак. № 414. М-56175. Тираж 1100. Цена 1 р. 08 к.

Ленинградское отделение издательства «Наука»
199164, Ленинград, В-164, Менделеевская линия, д. 1

1-я тип. издательства «Наука»

199034, Ленинград, В-34, 9 линия, д. 12